

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**Zbytky potravin na archeologických  
artefaktech a ve výplni objektů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BC. MAREK HONS

*PŘÍRODOVĚDNÁ STUDIA, OBOR BIOLOGIE SE ZAMĚŘENÍM NA VZDĚLÁVÁNÍ*

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, PhD.

**PLZEŇ, 2022**

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

V Plzni, 30. června 2022

.....  
vlastnoruční podpis

## **Poděkování**

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

## Obsah

1. Úvod.....	2
1.1 Cíle práce .....	3
1.2 Historie .....	5
1.2.1 Identifikace kuřecího a vepřového masa – odlišené od kontaminací .....	6
2. Testování zbytků organického charakteru na archeologické keramice .....	9
2.1 Metoda hmotnostní spektrometrie .....	9
2.2 Metoda antigen-protilátka.....	11
3. Proteiny (bílkoviny) .....	14
3.1 Nejstarší dosud identifikované proteiny .....	15
3.2 Testované proteiny v této práci .....	18
3.2.1 Gliadin – protein charakteristický pro obilniny.....	18
3.2.2 Ovomuroid – protein charakteristický pro vejce .....	18
3.2.3 Kasein – protein charakteristický pro mléko .....	19
4. Materiál a metody .....	20
4.1 Postup analýz.....	21
5. Výsledky .....	23
5.1 Výsledky – Tab. 1. ELISA testy na proteiny z potravin z archeologických vzorků .....	25
6. Diskuse .....	27
7. Závěr.....	35
8. Shrnutí.....	36
9. Resumé.....	36
Seznam literatury .....	38
Internetové zdroje.....	48
Seznam obrázků .....	49
Seznam Tabulek .....	50

## 1. Úvod

Všechny vzorky, které byly analyzovány specializovanými metodami pro tyto účely v této diplomové práci jsou z období pravěku (mladší doby bronzové), a to z lokality Březnice u Bechyně. Práce má několik cílů, jedním je objasnit skladbu jídelníčku lidí z období mladší doby bronzové, kteří žili v této lokalitě (Březnice u Bechyně), analyzovat složení uvnitř poněkud záhadných tzv. žlabovitých objektů a přispět tak poznání jejich funkce a v neposlední řadě otestovat antigenní kit pro drůbeží proteiny na archeologické keramice přibližně 3000 let staré.

## 1.1 Cíle práce

Pro účely této studie (diplomové práce) byl jeden ze stěžejních záměrů charakterizovat výplně různých objektů a pokusit se interpretovat, jaké procesy vedly k tvorbě materiálu, který byl v objektech uložený. V této souvislosti šlo o to přispět k debatě o původu vzniku a funkci žlabovitých objektů, které se nalézaly na zkoumané lokalitě Březnice u Bechyně z mladší doby bronzové a najít proteiny z potravin i na dalších objektech mnohdy neznámé funkce.

Za pomoci antigenních testů, které se ukázaly jako vhodné pro detekci historických proteinů, převážně z potravin a nachází se v keramice byly analyzovány vzorky i v této diplomové práci (Pavelka a Vařeka 2008; Šálková et al. 2015; Čiperová et al. 2015; Pavelka et al. 2016; Hons 2020). Vzorky byly odebírány a následně byly prováděny analýzy sedimentů z povrchových vrstev různých artefaktů a také i přímo z výplně různých objektů, aby se získaly informace o druhu výplních nalezených žlabů, které mají značně nejasný původ a funkci. Zároveň se prováděla i analýza kontrolních vzorků odebraných z vrstev podloží, kde se objekty nebo artefakty nacházely. Byly také testovány keramické zlomky a další keramické nádoby na výskyt bílkovin (proteinů), zde bylo využito podobného postupu na bázi antigen-protilátek (Čiperová et al 2015; Hons 2020). Za využití antigen-protilátkových testů nazývaných jako ELISA testy (enzyme-linked immuno sorbent assay) byl testován výskyt bílkovin (proteinů) vepřového vařeného masa, vepřového nevařeného masa, drůbežího vařeného masa, drůbežího nevařeného masa, hovězího masa, vajec (ovomucoid protein), obilí (gliadin protein) a rovněž také mléka (kasein protein) (Čiperová et al 2015; Hons 2020). Jako problematické se zpravidla jeví zejména testování protilátek na výskyt masa ve vzorcích odebraných z archeologických objektů, artefaktů a štěpů, v minulosti kvůli nevhodným protilátkám, nyní spíše pro riziko kontaminací. Velmi dobře bývají detekovány zejména historicky denaturovaný (tepelně upravený) proteiny. Tyto proteiny se v minulosti upravovaly zejména vařením, ale jsou možné i jiné tepelné úpravy, z toho vychází i příprava protilátek, které nebyly vytvořeny na nativní (čerstvé) antigeny, ale pro tepelně denaturované antigeny.

Archeologické vzorky v této práci byly podrobeny dvěma testům (testy na maso neboli svalové proteiny). Nejprve byl proveden antigen-protilátkový test vzorků na maso (drůbeží, vepřové a hovězí) tato hodnota byla zaznamenána a následně vzorek podstoupil úpravu formou tepelné modifikace proteinů (vařením). Tato tepelná úprava se již denaturovaných archeologických prvků ve formě proteinů nedotkne (nijak je neovlivní). Zatímco proteiny, které se ve vzorku nacházely a nebyly dosud denaturovány, tak vlivem tepla z vaření se denaturují, což povede k navázání protilátek. Za předpokladu, že dojde ke zvýšení naměřených hodnot po této uměle simulované denaturaci proteinů v laboratorních podmínkách, tak je možno získat informaci, že se původně jednalo o nevařené tedy tepelně nezpracované zbytky z různých tkání nebo že se jedná o proteiny z trusu (Pavelka et al. 2020).

## 1.2 Historie

Analýzy měly prověřit výskyt proteinů (bílkovin) z potravin v sídlišti v lokalitě Březnice u Bechyně datované přibližně do období 1200–1000 let před našim letopočtem. Toto sídliště Březnici u Bechyně se odlišuje od podobných sídlišť ze stejné doby existencí velkého množství žlabů. Podobné žlaby jsou známé zejména ze západních Čech (Pavelka ústní sdělení) a také z Bavorska, kde se na rozdíl od českých lokalit našlo spojení se sídlištními budovami (Geck a Seliger 1991). V dalších lokalitách z doby bronzové (pravěku) se podobné žlaby nevyskytují, což naznačuje, že zmíněné regiony, tedy Bavorsko a západní, respektive jižní Čechy, byly nějak kulturně spojeny (Chvojka et al. 2019). Zda šlo také o nějaké etnické spojení by mohly prokázat širší analýzy ancient DNA z kosterního materiálu, což je bohužel dosti obtížné, protože v této době a regionu převládalo spalování zemřelých. I když existují i kostrové pohřby, kde ovšem podobný výzkum na aDNA zatím nebyl proveden. Sídliště v Březnici u Bechyně se v ostatních parametrech podobá jiným sídlištím z téže doby (Chvojka et al. 2021b). Vysvětlení funkce žlabů je dosud poněkud nejasné, ale existuje několik teorií, které se o to pokouší. Jako první je souvislost s hrnčířstvím, protože se ve žlabech nalézá množství keramiky (nad 1000 zlomků), pak spojení s vařením, případně, že byly využívány na různé sušení, či ukládání odpadů, ale mnohem častěji se uvažuje o žlabech jako o základech tkalcovských stavů (Trnka a Přemyslovská 2013), nebo že se jedná o nějaké zápalné objekty, které souvisí s kultem (Vencel 2016). Protože se ve žlabech nachází sekundárně (druhotně) vypálená keramika, byl vysloven názor, že se jedná o takzvané přechodové rituály, podle této teorie mohli obyvatelé chápat domy jako živé bytosti a žlaby sloužily k jejich pohřbu (Kuna et al. 2012; Kuna v tisku).

Dalšími artefakty poněkud nejasné funkce, byly „pražnice“, běžně se jako pražnice označuje deska, jež je vyrobená z jílovité hlíny, která slouží k pražení zrní nebo pečení placek. V tomto případě se však může jednat o předměty jiného účelu. Byly nalezeny fragmenty, které se vyznačovaly plochým rozšiřujícím se dnem s vnitřním žlábkem, silně zaobleným okrajem a vnitřní část byla hladká. Tyto fragmenty byly z hrubé archeologické keramiky a vyznačovaly se silným přepálením (Chvojka a Menšík v tisku). Chvojka a Menšík (v tisku) uvažují, že by se mohlo jednat o pražnice, nebo o takzvanou mazanicovou keramiku, jakýchsi mis na nožkách, které možná sloužily jako nějaké malé oltáře a jako poslední možnost uvádí tzv. měsícovité idoly, což jsou předměty vyrobené z hlíny a mají



lichoběžníkovitý průřez a vytažené rohy, původně byly samostatné a později z doby železné jsou nacházeny připevněné k okrouhlé desce (Chvojka a Menšík v tisku).

### 1.2.1 Identifikace kuřecího a vepřového masa – odlišené od kontaminací

Předkládaná práce klade větší důraz zejména na imunologické testy než na archeologický kontext, proto zdůrazňuje podíl testů na drůbeží proteiny (kuřecí bílkoviny), který byl poprvé ve větší míře testován na keramické matrix pocházející z pravěku, konkrétně mladší doby bronzové. Všeobecně se uvažuje rozšíření drůbeže na našem území spíše až v pozdější době, zejména v halštatu a latěnu. Kyselý (2010) zpracoval na základě osteologického materiálu nejstarší nálezy na území naší republiky a určil jako první hodnověrný nález osteologický materiál z konce doby bronzové v časovém určení přibližně poloviny 9. století př.n.l. na lokalitě Ostrov u Záp v okrese Praha-východ (Kyselý 2010). Sídliště v Březnici je však o něco starší, a proto by potvrzení drůbežích proteinů (kuřecích bílkovin) představovalo doklad, že běžný chov drůbeže na našem území sahá i do starších dob. Důkaz drůbeže, zejména kura domácího (*Gallus gallus*) byl dosud podáván jen na základě osteologického materiálu, avšak existence drůbežích proteinů, respektive větší koncentrace drůbežního trusu na sídlišti může představovat další spolehlivou metodu pro zjišťování přítomnosti drůbeže v minulosti. Malé kosti drůbeže také mají menší šanci pro zachování než zejména velké kosti skotu (*Bos primigenius*), proto je důkaz drůbežích proteinů pomocí dalších metod důležitý. Hmotnostní spektrometrie je v současnosti uznávanější metodou než detekce pomocí protilátek, nicméně protilátky mohou mnohdy zachytit i poměrně malé množství proteinů, které hmotnostní spektrometrie nezachytí, nebo správně nerozliší, proto metoda detekce dalšího živočišného druhu je pro poznání minulosti důležitá. Přesvědčivým důkazem existence drůbeže v minulosti jsou tepelně upravené (denaturované, uvařené) proteiny v keramice, protože proteiny z trusu se do keramiky, či do bývalého sídliště mohly dostat ze současných zemědělských hnojiv.

Podle tradičního pojetí není kur domácí (*Gallus gallus f. domestica*) původem z Evropy a dostal se se sem z Asie později než ostatní domácí zvířata, která byla dovezena, nebo zdomácněla neolitické expanze (Zeuner 1963; West a Zhou 1988). Na základě archeologických, historických a molekulárních dat bylo v jižní a jihovýchodní Asii

identifikováno hned několik center domestikace. Hlavním předkem kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*) je divoká forma kur bankivský (*Gallus gallus*), ale ke genetické výbavě současného kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*) také přispěl kur Sonnerattův (*Gallus sonneratii*). Genetická variabilita od původních obou divokých ptáků (kurů) je nyní distribuována jak mezi tradiční populace, tak standardizovaná plemena a vysoce vybrané linie (Tixier-Boichard et al. 2011). Ale molekulární data obtížně stanovují přesnější časové určení, kdy k domestikaci pravděpodobně došlo. Historické poznatky kladou používání kura ke kohoutím zápasům, v Indii údajně až do doby před osmi tisíci lety (Stevens 1991). Je otázka, jak se drůbež do Evropy vůbec dostala. Šíření mohlo probíhat pravděpodobně dvěma způsoby. Zaprvé z Asie buď jižní cestou přes Persii a Balkán nebo jak navrhuji West a Zhou (1988) severní cestou přes Čínu, Mongolsko a Rusko (Kyselý 2010). Nicméně mohlo to být oběma cestami.

Podle Westa a Zhoua (1988) je hlavním obdobím expanze domácí drůbeže v Evropě doba železná, nejstarší osteologické nálezy však pocházejí z neolitu (mladší doba kamenná) a starší doby bronzové z Řecka a Ukrajiny. Další nálezy kostí, které byly určeny jako *Gallus gallus f. domestica* (kur domácí), *Gallus gallus* (kur bankivský) a *Gallus sp.* jsou datovány od paleolitu (starší doba kamenná) do doby bronzové v Rumunsku, na Ukrajině a v oblasti Kavkazu (Boev 1995). Některé neolitické až eneolitické nálezy z východní Evropy jsou uváděny i z dalších lokalit (Benecke 1994a; Mlíkovský 2002), femur (kost stehenní) *Gallus sp.* z neolitu pochází z moskevské oblasti z období 3000-2600 př. n. l. (Karchu 1990). Burčak-Abramovič et al. (1986) uvádí, že domácí drůbež existovala ve starověké Arménii na počátku druhého tisíciletí před naším letopočtem. Jedním z potenciálních počátečních míst expanze domácí drůbeže (kur domácí) v Evropě je Řecko. V Řecku je kur znám od 5. do 8. století před naším letopočtem (Boev 1995). Ve starověkém Řecku kura domácího nazývali „perský pták“ což píše např. Aristofanés (Benecke 1994b), to by mohlo znamenat, že Řekové znali kura domácího od Peršanů (tj. přibližně od 6. století př. n. l., kdy vznikla Perská říše). Navíc Peršané pravděpodobně dovezli domácí drůbež do Egypta, kde první osteologický nález pochází z konce 5. - počátku 6. století př.n.l. (MacDonald 1993). V 5. století př. n. l. je v Řecku na venkově drůbež již zcela běžně a je spojena s bohem Asklépiem, magickými praktikami a kohoutími zápasy, zatímco maso a vejce byly možná méně důležité (Nauerth 1986). Přesto ale by měla být drůbež v Řecku známá dřív, už v pozdním neolitu

(mladší době kamenné) a době bronzové (West a Zhou 1988). Ve střední Evropě, která nás zajímá vzhledem k lokalitě Březnice, je drůbež známá z doby halštatské tedy od 8. století př. n. l. (Bouzek 2004; Jiráň et al. 2008). Benecke (1993) dokumentuje postupný nárůst kostí drůbeže na archeologických nalezištích od doby železné, přes dobu římskou až po raný a vrcholný středověk. V rámci Čech je situace podobná (Peške 1994). Potenciálně nejstarší nálezy ze střední Evropy pochází údajně z kultovní jeskyně pozdní doby bronzové v Kyffhäusergebirge (Teichert a Lepiksaar 1977). Identifikace proteinů (bílkovin) z lokality Březnice u Bechyně, případně na dalších lokalitách doby bronzové by mohly změnit pohled na nejstarší běžný výskyt drůbeže v Čechách, případně v celé střední Evropě.

## 2. Testování zbytků organického charakteru na archeologické keramice

### 2.1 Metoda hmotnostní spektrometrie

Organické zbytky, které je možno nalézt na nejrůznějších historických (archeologických) artefaktech, nebo v kostní hmotě, je možno analyzovat řadou metod. Nejuznávanější metodou současnosti je hmotnostní spektrometrie MS, anglicky (Mass Spektrometry). Tato metodika je používána na proteiny z osteologického materiálu i na analýzu archeologické (historické) keramiky. Tato průlomová metoda byla úplně poprvé využita pro archeologické pozůstatky potravin během roku 1991 (Oudemans a Boon 1991; viz. Hons 2020). Aby bylo možné tuto metodu využívat pro analýzu vzorků, tak je třeba vzorky v tomto případě proteiny (bílkoviny) upravit. Po jejich modifikaci je možné provádět měření hmotnostní spektrometrie. Aby mohly být proteiny analyzovány, je nutno je modifikovat, obvykle v roztocích, zřídka se použije elektroforéza na gelu k tomu určeném (Barnard et al. 2007). Na fragmentaci testovaných proteinů se používá enzym trypsin, který vytváří z analyzovaného proteinu (bílkoviny) menší části. S těmito krátkými peptidy je možno provést vlastní analýzu pomocí hmotnostního spektrometru, kde dochází k vlastní analýze pořadí aminokyselin (Pollard et al. 2007; Barker 2010). Peptidické fragmenty je nutno rozpustit v odpovídajícím roztoku, kratší řetězce se chovají poněkud jinak, než dlouhé a dostávají se k podkladu díky vhodnému složení roztoku, také se mohou vhodně slučovat, u některých typů dochází k uchycení na podkladu jiné peptidy pokračují dál (Pollard et al. 2007; Barker 2010).

Hmotnostní spektrometr musí obsahovat několik základních částí, je to zejména analyzátor, následuje detektor částic, a klíčovou jednotkou přístroje je iontový zdroj (Friedecký a Lemr 2012). Iontový zdroj je schopen modifikovat neutrální plynové molekuly, které vznikají z testované látky na nabitě částice, což jsou ionty (Karasek a Clement 1988; Lee 2012). V analyzátoru se ionty určitým způsobem třídí podle svých efektivních hmotností. Tento způsob třídění umožňuje samotnou analýzu. Na tuto analýzu je samozřejmě v současné době nutný vhodný software, který zaznamenává množství určitých iontů v daném čase, to

se děje v části hmotnostního spektrometru označované jako detektor (Karasek a Clement 1988; Lee 2012). Je možno shrnout, že hmotnostní spektrometr využívá k detekci analyzované látky efektivní hmotnosti iontů jakožto nabitých částic, což lze vyjádřit vztahem (hmotnost iontu/náboj iontu) (Friedecký a Lemr 2012).

Začátek procesu v hmotnostním spektrometru je charakterizován postupným odpařováním vzorku, pak dochází k vlastní ionizaci, které je možno docílit několika způsoby, buď pomocí UV světla (APPI), nebo asi více používaného laseru (Friedecký a Lemr 2012). Pak musí dojít k třídění iontů podle jejich efektivní hmotnosti, to se děje v analyzátoru, tam se také generuje elektrické magnetické pole, které tomu třídění účinně pomáhá (Karasek a Clement 1988; Lee 2012; Friedecký a Lemr 2012). Pro fungování je nutná absence molekul vzduchu, proto je nutné, aby v částech přístroje, kde dochází k vlastní analýze bylo vysoké vakuum a celý systém musí být uzavřený, aby nedocházelo k jeho narušení (Karasek a Clement 1988; Lee 2012).

Touto metodou je možné analyzovat další látky nejen proteiny, avšak hmotnostní spektrometr musí být postaven na určitou analýzu, nelze v současné době na stejném přístroji analyzovat proteiny a vzápětí zcela odlišné látky. Na poněkud odlišně konstruovaných hmotnostních spektrometrech je možno analyzovat lipidy (tuky), které se v keramice uchovávají poměrně dobře. Další složkou potravin, kterou je možno analyzovat i po tisíciletích jsou rostlinné alkaloidy, které mnohdy odhalí konkrétní rostlinné složky potravy (Karasek a Clement 1988; Lee 2012).

Jako každá metoda má své výhody i nevýhody, kromě nesporných výhod jako je komplexní analýza vzorku k nevýhodám patří poměrně složitá příprava vzorku, to znamená kvalifikovanou obsluhu, také cena přístroje se pohybuje v miliónech korun (Barker 2010; Čiperová 2015). V některých případech je to také nedostatečná citlivost, mnohdy jsou analyzované proteiny, je kupříkladu jasné, že se jedná o nějakého savce, ale už nelze někdy určit o jaký se jedná druh, to je vidět na příkladu mléka. Pomocí protilátek šlo dříve velmi precizně určit kozí mléko, nyní lze velmi dobře aspoň rozlišit kravské mléko od jiných druhů, to zatím pomocí hmotnostní spektrometrie ale možné není (Pavelka a Vařeka 2008; Pavelka Orna 2011; Hons 2020). Samozřejmě technologie se vyvíjí, a tak lze očekávat, že i na tomto poli dojde v budoucnu ke zlepšení. Přesto asi hlavní nevýhodou zůstává cena přístrojů, které si v podstatě žádné archeologické pracoviště u nás nemůže dovolit<sup>[1]</sup>. Specializované

laboratoře, např. na VŠCHT mohou poskytovat servis i pro další přírodovědce, zejména biology, ale nevýhodou je poměrně velký zájem o tyto analýzy.

Mezi výhody této metody spektrometrie můžeme řadit vcelku snadnou opakovatelnost analýz vzorků. V současné době upřednostňuje hmotnostní spektrometrii oproti jiným metodám důvěra v tuto technologii, které se jeví jako fyzikálně přesně definovaná a vyznačuje se vysokou kvalitou dosažených dat (Barker 2010). Že to nemusí být vždy tak jasné je vidět na uvedeném příkladu s mlékem. Nicméně psychologie hraje také u vědců stejnou roli jako u jiných lidí, a tak pokud je metoda široce přijímána, nikdo o ní nepochybuje.

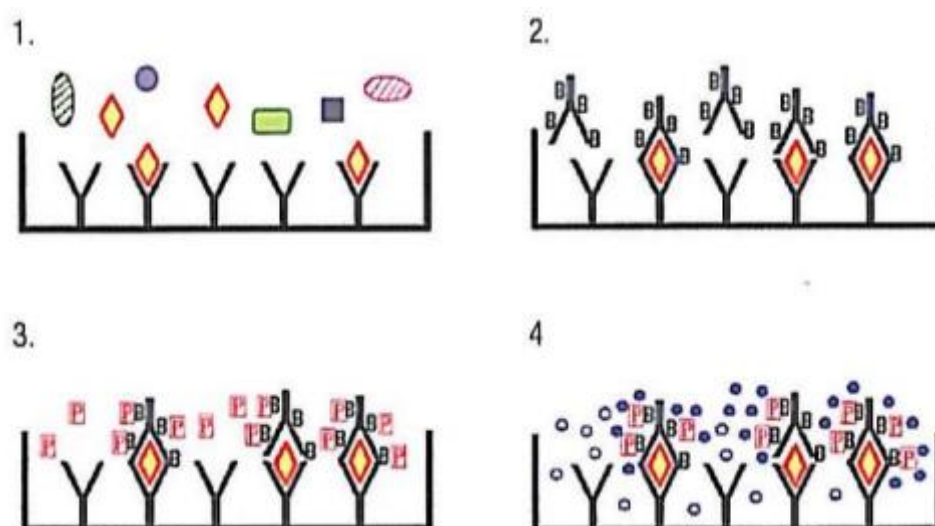
Velmi důležitou analýzou je separace a identifikace pomocí lipidů (tuků), příslušný hmotnostní spektrometr může do jisté míry odlišit tuk některých domácích zvířat (Mottram et al. 1999). Je možné některé skupiny od sebe odlišit, ale nelze mluvit o přesném rozlišení do druhů, na takové analýzy není hmotnostní spektrometrie nejlepší metodou (Cramp et al. 2014). O to vhodnější se jeví zkoumání rostlinných olejů, kde existence lněného, či kupříkladu olivového oleje má důležitou vypovídací hodnotu. Celkově je možno ale říci, že právě porézní vypálená keramika umožňuje uchování tuků, které jinak mají malou šanci na dlouhodobé uchování stovky a tisíce let. Za normálních okolností jsou vystaveny četným působením fyzikálních i biologických sil (viz Evershed 1993; Evershed et al. 1999).

## 2.2 Metoda antigen-protilátka

V této práci je využívána metoda založená na interakci antigenu a protilátky. Metodiku poznamenaly neúspěchy v minulosti, kdy byly používány na historické proteiny protilátky vyvinuté na čerstvý materiál (Child a Pollard 1992; Brandt et al. 2002). Samozřejmě je nutno používat protilátky vyvinuté na aktuální stav antigenů, jinak nelze docílit specifické selektivní reakce. Že proteiny časem degradují, je známým faktem, že tedy musí být připraveny protilátky na proteiny v tomto stavu už mnozí výzkumníci nerespektovali, a tak byla metoda označena jako nevhodná pro detekci historických proteinů.

Jedním z klíčových problémů v minulosti byly tzv. nespecifické reakce, označované jako cross-reakce, při této reakci dochází k navázání protilátky na jiný typ antigenu, než byl ten, proti kterému byla protilátka vyvinuta (Child a Pollard 1992; Brandt et al. 2002). Je sice pravda, že často nejsou tyto nespecifické reakce příliš silné, ovšem na vytvoření slabých falešně pozitivních výsledků je to postačující. Právě proto byly využity komerčně vyráběné protilátky, které jsou ověřené a certifikované, ale hlavně reagují na tepelně upravené a denaturované proteiny. Už dříve bylo upozorňováno, že musíme znát stav proteinů proti kterým máme použít protilátky (Craig et al. 2000). Použité komerční sady byly primárně vyvinuté na identifikaci alergenů, nebo na specifikaci původu masa, aby bylo jasné, zda výrobky opravdu obsahují deklarované složení, výhodou je univerzálnost a snadná dostupnost, jejich použití není vázáno na nějakou specifickou laboratoř, ale jsou normálně v prodeji. Tudíž analýzy může kdokoliv ověřit a zopakovat, zvláště proto, že postup není příliš náročný (Pavelka a Vařeka 2008; Pavelka a Orna 2011). Proč jsou tyto sady vlastně vhodné na historické proteiny? Hlavně v tom, že byly vytvořeny na denaturované proteiny a jejich pozměněné epitopy (Björklund et al. 2001). Tepelně upravené antigeny mají v keramice větší šanci být detekovány než nativní, které už změnilly svoji strukturu, tomu výrazně dopomáhá keramika, kterou jsou obklopeny (Pavelka et al. 2016).

Schéma této metody je možno vidět na obr. 1. níže.



**Obr. 1. Schéma testu na bázi systému antigen-protilátka (Neogen Corporation ®).**

Průběh ELISA testu viz Obr. 1. si popíšeme ve čtyřech krocích. Na první části obrázku dochází k inkubaci pozitivního testovaného vzorku. Odpovídající bílkoviny či jejich části jsou zachyceny protilátkami přichycenými na dně mikrotitrační jamky. Ty bílkoviny, které se nenašly, jsou odmyty pomocí promývacího roztoku. V druhé části obrázku vidíme přidávek druhotné protilátky s navázaným enzymem, který zde slouží pro zviditelnění reakce. V třetí části obrázku dochází k dalšímu promytí. Následně se přidávají další připravené roztoky z kitu, které slouží k identifikačnímu zabarvení reakce v mikrotitrační jamce. Běžně se přidává 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Ve čtvrté části obrázku dochází k aplikaci „stop“ roztoku, který zastaví probíhající reakce. obvykle se jako stop roztok využívá zředěná kyselina fosforečná případně zředěná kyselina sírová. Po aplikaci stop roztoku dochází k vybarvení (Bednář a Kučera 2021).

Sama firma (Neogen) definuje původní použití těchto protilátek z více důvodů, jak ekonomických, tak etnických. V případě masa může být taková identifikace navržena např. aby se zabránilo míchání masa určeného k lidské spotřebě s masem nevhodných nebo podřadných druhů, popř. může mít význam v různých náboženských komunitách, kde konzumace určitého druhu je zakázána [2].

Firma uvádí, že soupravy jsou rutinně používány po celém světě, a to zejména pro účely kontroly a určování druhů masa podle původu, což se týká vařených mas i mastných výrobků. Sady se také osvědčily při zjišťování, jakého původu je maso v kafilerích [2].



### 3. Proteiny (bílkoviny)

Proteiny česky bílkoviny jsou specificky vytvářeny každým organismem a pro živočišné druhy, které nejsou schopné fotosyntézy jsou také nenahraditelnou složkou výživy. V lidské výživě figuruje řada potravin s poměrně vysokým obsahem proteinů, zejména svalové proteiny, tedy maso zejména hospodářských zvířat, ale také ryby. Ale i některé rostlinné produkty mají velké procento proteinů, zejména sója a luštěniny. Nelze zapomenout na mléko, jehož nejvíce zastoupený protein kasein dělá z mléka potravinu, nikoliv nápoj (Doubrava et al. 1984). Primární struktura proteinů je tvořena aminokyselinami, které jsou spojeny peptidickými vazbami a vytváří dlouhé řetězce charakteru makromolekulárních sloučenin. Peptidická vazba mezi jednotlivými aminokyselinami je tvořena mezi karboxylem jedné aminokyseliny aminoskupinou druhé (Ledvina et al. 2009; Matouš 2010; Koolman a Röhm 2012). Struktura proteinů se může měnit, ať už v průběhu vzniku konkrétního proteinu, nebo různými přestavbami při posttranslačních úpravách, může docházet i ke štěpení uvnitř peptidových vazeb (Alberts et al. 2005). Prostorová konformace proteinů závisí dále na dalších vyšších strukturách, které spoluvtváří další vazby, například sulfidické můstky, ale svou roli také hrají vodíkové můstky a slabé van der Waalsovy síly (Alberts et al. 2005). Některé tyto vazby jsou relativně slabé a proto, po smrti organismu poměrně snadno povolují a struktura proteinu degraduje. Degradaci můžeme rozdělit do dvou typů, jinak je to lyzozomální a další je cytozolická (Alberts et al. 2005). Dochází k rozpadu a změnám právě ve vyšších konformačních strukturách, což jsou sekundární až kvarterní (Alberts et al. 2005). Primární struktura daná pořadím aminokyselin je poměrně stabilní, můžeme si ji představit jako vlákno, to se ale skládá a vytváří takzvanou sekundární strukturu  $\alpha$ -šroubovici, nebo  $\beta$ -skládaný list (Ledvina et al. 2009; Matouš 2010; Koolman a Röhm 2012). Ze sekundárních struktur se vytváří složitější konformace, které se označují jako terciální struktura proteinů (Alberts et al. 2005). Nejvyšší strukturou je kvarterní a ta je tvořena z více polypeptidových řetězců (Alberts et al. 2005). Známou kvarterní strukturou je kupříkladu hemoglobin, kde proteinová část globin, obsahuje neproteinový hem (Ledvina et al. 2009; Matouš 2010; Koolman a Röhm 2012). Je proto evidentní, že rozvolněná struktura proteinu je jiná, než zcela funkční a protilátky vytvořené proti jednomu typu nebudou fungovat na druhý, nebo bude navázání slabší. Vyšší živočichové mají

propracovaný imunitní systém, který je schopen tvořit protilátky proti zcela určitým proteinům, nebo případně dalším cizorodým strukturám, které na sobě nesou bakterie a viry, případně nějaké mnohobuněčné parazité. Protilátky se mohou za určitých okolností dokonce tvořit i proti vlastním strukturám (Alberts et al. 2005). Těchto vlastností organismů využíváme, když je necháme vytvářet protilátky, které potřebujeme, ty pak můžeme izolovat, nebo nejčastěji izolujeme B lymfocyty, které je vytváří a ty fúzujeme s buňkami, které jim umožní prakticky nekonečné přežívání za vhodných podmínek. Protilátky pak lze vyrábět ve větších množstvích. Ale stále platí, že protilátky reagují a váží se na struktury, které odpovídají antigenům, proti kterým byly vytvořeny. Těchto postupů se široce využívá v potravinářství (detekce druhu masa či mléka), ve výzkumu, nebo v lékařství, v našem případě pro detekci alergenů (Pavelka a Vařeka 2008).

### 3.1 Nejstarší dosud identifikované proteiny

Proteiny mohou vydržet nejen tisíce, ale zřejmě i milióny let. Na rozdíl od DNA, kde zřejmě něco takového není možné. Bohužel, z proteinů, lze získat pouze omezené informace, oproti DNA, přesto i tyto informace mohou být unikátní a přispět k poznání o minulosti. Už poměrně dávno se podařilo získat sekvenci z proteinu dinosaura *Tyrannosaurus rex* a mastodonta (*Mammot americanum*) (Asara et al. 2007). Byly to proteiny, které můžeme v kostech očekávat, a to kolageny alfa1 (I) a alfa2 (I), ze sekvencí těchto vymřelých tvorů vyplývá, že mastodont je podobný slonům a *T. rex* ptákům (Organ et al. 2008). Což je v souladu se současnými poznatky o evoluci. Zvláště v případě ptáků a dinosaurů někdy doznívají určité pochybnosti o přímé návaznosti. Podařilo se také získat proteiny z křídového druhu hadrosaura (*Brachylophosaurus canadensis*) (Schweitzer et al. 2009). V tak starých kostech je možno dokonce nalézt zbytky struktury tkání. Byla použita řada metod, především imunohistochemické, difrakční a spektroskopické a byla identifikována část kostní tkáně a cév, včetně již dříve v podobných případech nalezeného kolagenu typu I, který bylo možno identifikovat v cévách, pomocí metody FTIR, což je metoda, jejímž principem je absorpce infračerveného záření, které prochází vzorkem a ve výsledku vytváří graficky znázorněná FTIR spektra, což jsou jakési vzorce absorpčních pásů, které jsou charakteristické pro různě testované látky. Při porovnání spektra izolované vaskulární tkáně z *T. rexe* a kuřecího kolagenu typu I. vykazovaly obě spektra značnou podobnost,

podařilo se zde porovnat spektra pro proteiny Amid I, Amid II, Amid III (Boatman et al. 2019). Protože existovala řada pochybností o věrohodnosti získaných proteinů tolik miliónů let starých, práce posloužila jako důkaz, že jde o proteiny původního zvířete, a nikoliv o současné kontaminace. Pochybnosti ale zcela neustaly, proto přichází další práce, která má vysvětlit, proč se v této konkrétní kosti proteiny zachovaly. Byly zkoumány tafonomické poznatky a údaje o složení prvků. Získaná data ukazují, že po delším, subagotním rozpadu v ústí řeky byla studovaná kost *T. rex* pohřbena v hrubém pískovci, kde jeho kosti zkameněly při interakci s oxickými a potenciálně brakickými raně diagenetickými podzemními vodami. Jakmile se kost stala stabilní fosilií došlo k dalším chemickým změnám. Srovnání s jinými nedávnými studiemi ukazuje, že oxidující časně diagenetická mikroprostředí a diagenetické okolnosti, které omezují expozici perkolujícím (pronikajícím, vsakujícím) pórovým tekutinám, zvyšují potenciál zachování biomolekul tím, že podporují molekulární kondenzační reakce a brání chemickým změnám (Ullmann et al. 2021). Což bychom asi mohli jednoduše vysvětlit, že vhodná fosilizace zabránila opakovanému pronikání vody do kostní tkáně. Autoři dále uvádí, bylo zřejmě zásadní, že se kost vyhnula zdlouhavým interakcím s pozdně diagenetickými pórovými tekutinami, (diageneze je soubor pochodů, který mění substrát, v němž je fosilie uložena) (Ullmann et al. 2021). Což se dá asi chápat tak, že ze substrátu, ve kterém byla kost uložena nepronikaly tekutiny dovnitř kosti.

Podařil se i jiný dosud značně ojedinělý objev. Nalezly se ještě starší proteiny (bílkoviny), byly uloženy v uhličitanových konkrécích, o nichž už se dříve vědělo, že jsou schopny ochránit řadu fosilních látek, třeba i metabolitů jako je cholesterol (Plet et al. 2017). Byla nalezena konkréce, která uchovávala zbytky ichtyosaurů z jury (staré asi 187 miliónů let). Ichtysaurus, kterého se podařilo takto charakterizovat patřil k tehdy běžnému rodu *Stenopterygius*. Kromě kostí tam byly nalezeny proteiny, které vypadají jako červené a bílé krvinky, kolagen a už zmíněný cholesterol. Byly použity citlivé metody a techniky mikroanalýzy, včetně identifikace izotopů. Dosti překvapivé bylo to, že objekty připomínající krvinky byly čtyřikrát až pětkrát menší než podobné, které se nalézají v současných živočiších (Plet et al. 2017). Je možné, že je to přizpůsobení na malé množství kyslíku v atmosféře v této době (Plet et al. 2017). Ale to nebylo všechno, dochovalo se i něco málo z ichtyosauří kůže, kde lze rozeznat různé dermální i epidermální části. Pod nimi byla podle všeho další vrstva, asi tuková, podobně jako u dnešních mořských savců, třeba

kytvců, asi stejně jako u nich pomáhala nadlehčování při plavání a silně naznačuje, že šlo o teplotně závislá zvířata, nebo minimálně o tvory, kteří si potřebovali udržovat tělesnou teplotu. Byly nalezeny i keratinocyty a melanofory, ve kterých byl pigment. Analýza prozradila i že se v konkrétních nachází i eumelaninový pigment. To znamená, že máme nějakou konkrétnější představu, jak ichtyosaurus vypadal. Horní strana těla byla tmavá a břišní světlejší, což by nebylo nic zvláštního, ale uspořádání melanoforů může znamenat, že zvíře mělo výrazné barvy, které mohlo měnit, což je samozřejmě výhodné pro lov kořisti, kvůli větším predátorům, protože existovali i velcí predátoři. Takže se dá říci, že to mohlo být používáno k maskování a splynutí s okolím. Ale také to mohlo pomáhat regulovat tělesnou teplotu (Lindgren et al. 2018).

## 3.2 Testované proteiny v této práci

V této diplomové práci bylo prováděno testování hned na několik druhů proteinů, a každý z nich je specifický pro určitý druh potraviny. Například protein „Kasein“ je proteinem specifickým pro mléko čili jedná se o mléčný protein. Dále se na historické keramice a výplních objektu zkoumal protein charakteristický pro obilniny (gliadin). Poslední specifický protein, který bude zmíněn v této kapitole bude protein charakteristický pro vejce (ovomucoid).

### 3.2.1 Gliadin – protein charakteristický pro obilniny

Gliadin je protein typický pro obilniny všech možných druhů. Tento protein má globulární charakter, což je dáno mezivazebnými silami a vazbami samotnými, které se v molekulách tohoto proteinu vyskytují (Shewry et al. 2003). Vazby, které se zde nacházejí se dají charakterizovat jakožto kovalentní vazby, které se nacházejí mezi dvěma atomy síry, které vznikají chemickými procesy u cysteinu. Po chemické stránce je možné tyto vazby nazývat jako disulfidické můstky, kde „di“ vyjadřuje „dva“ a „sulfidické“ vyjadřuje již zmíněné síry, které mají v této formě oxidační číslo mínus dva (Shewry et al. 2003, Cammack et al. 2006). Tato molekulární stavba gliadinu mu umožňuje rozpouštění alkoholem za vzniku polymorfní směsi. Ale obecně se dá říci, že to je protein o struktuře jedno řetězových polypeptidů. To ho řadí mezi tzv. monomerní bílkoviny. Tento protein se v obilninách vyskytuje ve velmi vysoké míře, a to v řádech desítek procent (Anderson a Greene 1997).

### 3.2.2 Ovomucoid – protein charakteristický pro vejce

Protein charakteristický pro vejce je ovomucoid a v této práci byl na vzorcích analyzován. Je to protein, který se vyskytuje zejména ve vaječném bílku. Jedná se o protein, který má funkci trypsinového inhibitoru (Rimphanitchayakit a Tassanakajon 2010; Lineweaver a Murray 1947). Někdy je označován také jako „Gal d 1“ řadí se mezi alergeny, jelikož byly u tohoto proteinu detekovány antigenní determinanty (neboli epitopy) třídy IgE (Järvinen et al. 2007).

### 3.2.3 Kasein – protein charakteristický pro mléko

Kasein je protein charakteristický pro mléko, jedná se tedy o mléčný protein, který převažuje nad dalšími proteiny vyskytujícími se v různých druzích mlék. Je to tzv. fosfoprotein a v mléce ho lze najít ve dvou formách. První formou jsou micelární útvary a druhou formou, ve které ho lze najít v mléce jsou tzv. kaseinové komplexy (Kasper a Burghardt 2015; Velíšek a Hajšlová 2009; Svačina et al. 2008). Tyto micely jsou tvořeny z většího počtu proteinů a samotná struktura celé micely se jeví jako zrnitá. Tato strukturální konformace umožňuje tvorbu gelovité hmoty při procesu trávení v organismu. Tato hmota následně prodlužuje trávicí procesy (Cockburn 2010).

Kasein je velice důležitý mléčný protein, který se podílí na vývoji a růstu savců poté, co se dostanou na svět. Důležitost proteinu při kojení je zejména v jeho bohatosti na aminokyseliny a další nutné prvky pro vývoj nového organismu (slaná 2018).

## 4. Materiál a metody

Vzorky byly odebrány z archeologických artefaktů na lokalita Březnice u Bechyně a datované přibližně do rozmezí 9000-1200 let př.n.l. jedná se tedy o mladší dobu bronzovou do rozhraní stupňů Ha A2/B1 (Chvojka a Šálková 2010). Velikost lokality se dá odhadnout na základě uskutečněných povrchových sběrů, geofyzikálních průzkumů a uskutečněných sond na cca 300×150 m, tj. 4,5 ha. Sídlní areál u Březnice poskytl celkem 55 zahloubených objektů, pro nás je zajímavých zejména 10 lineárních žlabovitých objektů (jeden z nich je tvořen čtyřmi samostatnými jámami v jedné linii), dále jsou tam například zásobní jáma, zásobnicové nádoby, jeden keramický depot, kúlové jámy a další (podrobněji viz Chvojka a Šálková 2010).

K dispozici na analýzy byly použity vzorky: 3 kamenné podložky, 4 „pražnice“, 12 výplně žlabů, 3 vzorky z misky a 1x podloží, 1x sonda, kontrolní čerstvý trus kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*).

Z keramické matrix bylo oškrábáno několik mikrogramů (mg) materiálu, takže ve výsledku byl k dispozici velmi jemný prášek tvořený původní keramikou s nasáklými proteiny (bílkovinami) a lipidy (tuky), které ale nebyly analyzovány. Z výplně žlabů byly použity vzorky zeminy.

Na vzorky bylo aplikováno několik kitů Neogen Corporation® Neogen 620 Lesher Place, Lansing, MI 48912 USA. Jedná se o tyto produkty:

MEAT DIFFERENTIATION, RAW MEAT, COW, PIG, SHEEP, POULTRY 96

MEAT DIFFERENTIATION, COOKED BEEF 48 MEAT DIFFERENTIATION, COOKED PORK

MEAT DIFFERENTIATION, COOKED POULTRY 48

VERATOX® FOR CASEIN ALLERGEN TEST KIT 48

Veratox for Gliadin – range 2.5-25 ppm, up to 38 samples. 48

## 4.1 Postup analýz

Testovací sady „Cooked Species Identification Test Kit“ jsou sendvičové typy EIA, které využívají značení pomocí biotin-avidinu. Proteiny ze vzorků byly extrahovány jednoduše pomocí fyziologického roztoku a extrakt byl napipetován do plastových mikrojamek potažených purifikovanými druhově specifickými protilátkami [2]. Se zvýšenými koncentracemi druhově specifických antigenů v extraktu, se navážou antigeny na protilátky, které jsou připojené k jamce. Aby reakce správně probíhala, musí být nenavázaný materiál odstraněn promytím (ideálně několikrát). Specifický antigen (protein), který je navázaný na jamku potaženou protilátkou se zviditelňuje nejprve reakcí s biotinylovanou specifickou protilátkou (sekundární protilátka) a potom konjugátem streptavidin peroxidázy.

Po každé inkubaci se přebytek činidla odstraní promytím (několikrát). Nakonec se navázaná peroxidáza zviditelní přidáním fixního množství substrátu TMB, který vytvoří modrou barvu, ta se změní na žlutou po přidání specifického činidla [2]. Intenzita barvy je úměrná původnímu množství specifického antigenu (proteinu), kvalitativní odhad původního množství je možno provést buď vizuální kontrolou nebo pomocí spektrofotometru, případně čtečky destiček [2]. Při hodnocení je potřeba porovnávat vzorky s negativní i pozitivní kontrolou. A v našem případě bylo měření intenzity reakcí provedeno pomocí spektrofotometru ELISA READER VERSAmax™ (Molecular Devices), při vlnové délce 450 nm (nanometrů).

Postup:

- 1) Pipetování 100 µl jednotlivých vzorků a pozitivní a negativní kontroly do testovacích mikrotitračních jamek.
- 2) Inkubace při pokojové teplotě po dobu 45 minut
- 3) Promytí každé jamky 3 (třikrát alespoň) promývacím roztokem
- 4) Napipetování 50 µl roztoku Dispense Species Biotin, což je příslušná sekundární protilátka, do všech testovacích jamek
- 5) Inkubace při pokojové teplotě po dobu 45 minut



- 6) Promytí každé jamky 3 (třikrát) promývacím roztokem
- 7) Napipetování 50  $\mu$ l konjugátu avidin peroxidázy do všech testovacích jamek
- 8) Inkubace při pokojové teplotě po dobu 15 minut
- 9) Promytí každé jamky 5 (pětkrát) promývacím roztokem
- 10) Napipetování 100  $\mu$ l roztoku substrátu TMB do každé testovací jamky
- 11) Inkubace při pokojové teplotě po dobu 45 minut
- 12) Napipetování 50  $\mu$ l roztoku Dispense Stop Solution do všech testovacích jamek
- 13) Měření absorbance (450 nm) u každé testovací jamky
- 14) Vyhodnocení intenzity reakce podle naměřených hodnot s ohledem na pozitivní a negativní kontroly <sup>[viz 2]</sup>
- 15) Zanesení získaných dat do přehledné tabůlky viz Tab. 1.

## 5. Výsledky

Pomocí detekce potravinových protilátek bylo analyzováno 24 vzorků sedimentu, z nichž některé byly určovány pomocí několika protilátek – celkem tedy bylo provedeno 73 testů na vzorcích z archeologické keramiky a výplně objektů.

Testované objekty byly archeology rozděleny podle vizuálních charakteristik. Při testování povrchu tří „kamenných podložek“ se ve všech případech ukázala přítomnost tepelně upravených (denaturovaných) proteinů (bílkovin) prasat (*Sus scrofa*). Vepřový trus se identifikovat nepodařilo (Tab.1). Drůbeží proteiny (bílkoviny) byly u „kamenných podložek“ zastoupeny jen v jednom jediném případě. Trus drůbeže u těchto archeologických objektů z finančních důvodů nebyl testován. Mléčný protein (neboli kasein) nebyl nalezen, ani vaječný protein (neboli ovomucoid), nicméně se ve dvou případech podařilo identifikovat obilný protein (byl testován gliadin). Další čtyři objekty byly označeny jako takzvané „pražnice“, i když, zda jde opravdu o pražnice je poněkud nejisté. Tyto objekty vykazují téměř shodné proteiny (bílkoviny), byly zde nalezeny tepelně upravené (denaturované) proteiny prasat i drůbeže a možná je tam i příměs drůbežího trusu (Tab.1 1/07, A 31262). Na povrchu jedné „pražnice“ byl identifikován i velmi slabý signál pro kasein (mléčný protein). Obilný protein (neboli gliadin) nebyl u „pražnic“ detekován vůbec. Další vzorky pochází ze žlabových objektů a jsou charakterizovány jako takzvané „výplně“. „Výplně“ objektu dávají nepříliš konzistentní (jednotné) výsledky. Z osmi testovaných vzorků na proteiny prasat (*Sus scrofa*) bylo šest pozitivních na vepřové maso a dva negativní, zdá se, že neobsahují trus prasat, alespoň dle dosud získaných výsledků. Na drůbeží proteiny bylo testováno sedm vzorků, u dvou bohužel nebyl proveden test na trus, ale zbývajících pět vykazuje celkem jasnou charakteristiku typickou pro poměrně silnou přítomnost trusu a žádnou přítomnost tepelně upravených (neboli denaturovaných) svalových proteinů, podobně jako u kontroly, kdy byl testován čerstvý trus kura domácího (také *Gallus gallus*) (Tab.1). Dvakrát byly pozitivně testovány proteiny skotu (též *Bos primigenius*). Desetkrát bylo u „výplní“ analyzováno mléko, tedy mléčný protein kasein. Třikrát byl zaznamenán silný signál, jednou byl slabý a jednou velmi slabý (viz Tab.1). Čtyřikrát byl kasein detekován jako negativní. Rovněž desetkrát bylo analyzováno obilí, tedy přítomnost proteinu gliadinu. Jednou byl zaznamenán silný signál, dvakrát slabý a sedmkrát bylo detekční měření

vyhodnoceno jako negativní. Podrobně byla hodnocena miska, kde se analyzovala tmavá a světlá vrstva na archeologické keramice a podloží, kde byla miska nalezena. Ve všech třech případech byl identifikován trus prasat, nikoliv tepelně upravené (denaturované) proteiny, což naznačuje sekundární uložení v odpadu, případně se tam mohl trus dostat dodatečně, např. spodní vodou. Drůbeží proteiny vyšly poněkud odlišně. Nečekaně byly tepelně upravené proteiny nalezené v podloží, silněji ve světlé vrstvě a v tmavé vrstvě byl kuřecí trus, je možné, že je také v podloží a světlé vrstvě, avšak pro přítomnost historických tepelně upravených (denaturovaných) proteinů nelze přítomnost trusu dokázat. Ve všech třech testovaných vzorcích byly nalezeny hovězí proteiny. Kasein (mléčný protein) byl nalezen v slabší koncentraci v podloží pod miskou a velmi slabě také ve světlé vrstvě. Gliadin nebyl testován. Podloží pod nálezy bylo testováno na drůbeží proteiny a prokázal se jen drůbeží trus, dále bylo ještě negativně testováno obilí (na protein gliadin).

Veškeré data jsou zaznamenána v Tab. 1. a samotná vysvětlivka k Tab. 1. je ve formě Obr. 2. a Obr. 3. viz níže.

5.1 Výsledky – Tab. 1. ELISA testy na proteiny z potravin z archeologických vzorků

		vepřové nevařené	vepřové vařené	Drůbež nevařené	Drůbež vařené	hovězí	kasein – mléko	ovomucoid – vejce	gliadin – obilí
12/06, A 27637	kamenná podložka povrch	++	++	0		++	0	0	++
2/09	kamenná podložka povrch	+	+	+		++	0	0	0
6/07, A 31804	kamenná podložka povrch	+	+	0		++	0	0	++
5/07, A 31332	Pražnice povrch vápno	++	++	++	++		0		0
5/07, A 31332	Pražnice povrch organika	++	++	++	++		0		0
1/07, A 31262	Pražnice povrch	++	++	+	++		+0		0
6/07, A 31797	Pražnice povrch	++	++	++	++		0		0
1/07	výplň objektu	++	++	0		++	0	0	+
5/07	výplň objektu	+	+	0		++	0	0	+
2/19	výplň objektu pod mazanicí					+	+		0
8/19	výplň objektu	++	++	0+	++		++		0
12/19	výplň objektu	+	+	0+	++		0		0
13/19	výplň objektu	0	0	0+	++		++		0
18/19	výplň objektu			0+	++		0		0
19+20/19	výplň objektu	+	+				++		0
30/19	výplň objektu	++	++						
30/19	výplň objektu								++
45/19	výplň objektu					+	0		
47/19	výplň objektu	0	0	0+	++		+0		0
8/19	Miska světlá vrstva	0	++	++	++	+	+0		
8/19	Miska tmavá vrstva	0	++	0+	++	+	0		
8/19	Miska podloží	0	++	+	++	+	+		
31/19	podloží			0+	++				0
	Sonda 30			++	++		0		
Kontrola k drůbežím a prasečím proteinům – čerstvý trus od kura domácího ( <i>Gallus gallus</i> ) a půda z výběhu domácích prasat ( <i>Sus scrofa</i> )									
		0+	+++	0+	++				
				0+	0+ (65° C)				

+++ extrémně silný signál  
++ silný signál  
+ slabší signál  
0+ velmi slabý signál, možná i nespecifická reakce

**Obr. 2. Vysvětlivka k Tab. 1.**

0	Negativní výsledek
<b>Nevařeno</b>	Reagují vařené proteiny (bílkoviny) – projevují se historicky vařené (denaturované)
<b>Vařeno</b>	Projeví se trus (hnůj), při vaření proteinů se denaturují proteiny z mukózní sliznice ze střev

**Obr. 3. Vysvětlivka k Tab. 1.**

## 6. Diskuse

Pomocí analýzy a detekce se nám podařilo prokázat, že proteiny z vepřového masa a hovězího masa jsou přítomny ve vzorcích z archeologických výplní objektů i na všech artefaktech, kam se řadí jak „pražnice“, tak kamenné podložky. Došlo také k potvrzení hovězích denaturovaných (tepelně opracovaných) proteinů (bílkovin) na geologické podložce pod analyzovanou „miskou“ u objektu 8/19 viz Tab. 1.

Dále bylo testováno, zda proteiny prasat, které měly pozitivní signály budou mít tyto signály silnější po povaření, což by dokazovalo přítomnost tepelně nezpracovaných proteinů, pravděpodobně z trusu zvířat. Avšak kromě jednoho případu nebyl zaznamenán po povaření silnější signál. Zdá se, že u podložek a „pražnic“ nejsou přítomné kontaminace a podařilo se zachytit původní proteiny prasat tepelně upravené v minulosti. U vzorků z kamenných podložek byly také identifikovány proteiny skotu. Ale v tomto případě nelze rozhodnout, zda se jedná o proteiny z tepelně upravovaného hovězího, nebo o proteiny z bukálních střev skotu, tedy o proteiny, které se vyskytují v trusu zvířat. Nebyly zde zaznamenány proteiny mléka, za to proteiny z obilí.

Zastavme se u objektů označených jako „pražnice“. Pokud by se jednalo skutečně o pražnice musely by být detekovány stopy po gliadinu (obilném proteinu), je otázka nakolik se uvolní gliadin z pražených zrn, ale pokud by se na pražnici pekly obilné placky, je detekce gliadinu i po tisíciletích velmi pravděpodobná.

Musíme předpokládat, že stopy po obilí a následně jeho zpracování různými způsoby budou v místě nálezů objektů a artefaktů, ze kterých byly odebírány vzorky všudypřítomné. Obzvláště vzhledem k přihlídnutí k době, z které pocházejí tyto artefakty (pravěk, doba bronzová). Během detekce se ale podařilo získat překvapivé výsledky, které zcela neodpovídají předpokladu. Vzhledem k tomu, že výsledky i ze stejného objektu jsou odlišné. U artefaktů A 31332 (Pražnice povrch vápno a Pražnice povrch organika) se obilný protein (gliadin) nepodařilo prokázat v žádné míře. U objektu 6/07 byla provedena analýza na gliadin u obou artefaktů z tohoto objektu. Z těchto získaných dat ohledně positivity na obilný protein (gliadin) můžeme usuzovat pouze o místním zpracování obilí a jeho produktů pouze na některých nalezených artefaktech. Kamenná podložka měla pravděpodobně nějakou souvislost s obilnými produkty, ve dvou ze třech případů bylo obilí silně

detekováno, nicméně pokud by to sloužilo k přípravě, očekávali bychom silný signál ve všech třech případech. Nicméně mohlo v jednom případě dojít ke zničení proteinů. Na podložkách jsou také přítomny proteiny tepelně upraveného vepřového masa, drůbeží na těchto objektech testované nebylo. Ale vepřové proteiny nejsou detekovány zvláště silně, což by se u nějaké „pečicí plotny“ dalo předpokládat. Snad se jednalo jen o plochu na uskladnění. Naopak „pražnice“ vykazují velmi silný signál pro tepelně upravené proteiny drůbeže i prasat, ale žádný signál pro obilniny. Nezdá se tedy pravděpodobné, že šlo o skutečné pražnice, spíše o nějaké keramické předměty sloužící k tepelné úpravě masa. Archeologové bohužel neposkytli fotografie zbytků předmětů, a tak si nelze udělat dobrou představu a dodaný popis je poněkud nejasný. Také je potřeba uvážit nakolik jsou tyto předměty kompletní, části keramiky mohou chybět a pokud zde byly nějaké dřevěná držadla, či podstavce, tak nejsou pochopitelně dochované.

Během práce byl analyzován i čerstvý drůbeží trus, v tomto případě byl použit trus kura domácího (*Gallus gallus*). Tento trus byl testován v čerstvém stavu. Potom byl čerstvý trus vystaven denaturaci formou povaření po dobu cca patnácti minut při teplotě 100 °C (stupňů Celsia). Avšak bylo potřeba prověřit, zda nedochází k významné tepelné denaturaci i při nižší teplotě, tím by byla ovlivněna důvěryhodnost testů. Jelikož je všeobecně známo, že teplota v kompostovacích prostorách obzvláště v letních měsících může dosahovat až 65 stupňů Celsia (Xu et al. 2009). Z tohoto důvodu se provedlo i kontrolní otestování drůbežního čerstvého hnoje zahřívání po dobu jednoho dne právě při teplotách podobných teplotám dosahujícím v kompostu (65 °C). Prokázalo se, že v případě že vzorek nebyl zahříván, nebo teplota byla 65 °C byla detekována hodnota na samotné hranici možné detekovatelnosti označené jako (0+), rovněž nazývané jako „velmi slabý signál“ případně možná i „nespecifická reakce“ viz Obr. 3. výše. A to i přes velmi silnou koncentraci drůbežích proteinů u této kontroly. Silné signály byly zaznamenány až u působení vyšších teplot a to cca 100 °C. Je to důkaz, že lze spolehlivě rozlišit původně tepelně upravené (denaturované) proteiny od tepelně neupravených (nedenaturovaných). To samozřejmě představuje kromě výhod i omezení, v případě žlabů, kde bylo dokázáno, že hořel oheň, by nemělo být možno určit, zda se jednalo o proteiny trusu, nebo ne. Nicméně to možné je. Znamená to, že drůbeží trus se tam dostal sekundárně až po spálení, nebo že oheň nehořel všude.

Při analýze archeologických vzorků na přítomnost proteinů z drůbežího masa (kuřecí, *Gallus gallus*) bylo otestováno 19 vzorků z 24 celkových vzorků na „drůbeží nevařené“ proteiny a 14 vzorků z celkových 24 na „drůbeží vařené“ proteiny. Čili byla provedena detekce na výskyt drůbežích proteinů i drůbežího trusu. Vzhledem k nemožnosti určení konkrétního druhu drůbeže pomocí této metody lze pouze usuzovat, že se jedná s největší pravděpodobností o kura domácího (neboli *Gallus gallus*), který byl podle všeho v době bronzové častější než jiná drůbež, ale zde jsme na půdě hypotéz. Drůbeží vařené proteiny byly detekovány silným signálem u všech 14 testovaných (analyzovaných) vzorků z celkových 24 archeologických vzorků. Testované vzorky na drůbeží vařené maso byly vybrány podle výsledků na nevařené drůbeží. Ty vzorky, které vykazovaly slabý nebo velmi slabý signál byly následně převařeny a otestovány znovu, tentokrát s pozitivním výsledkem, což dokazuje, že se zde nacházelo velké množství drůbežího trusu. Pouze v několika případech vyšel velmi silný signál na drůbeží nevařené proteiny (Tab.1.). Z toho lze usuzovat, že drůbež (pravděpodobně *Gallus gallus*) v té době byla obyvatelstvem této lokality využívána, snad více pro vejce než pro maso samotné. Vzhledem k tomu, že trus tohoto zvířete byl v půdě všude přítomný, tak se posléze dostal i zkoumaných keramických zlomků, objektů a celkově do všech archeologických artefaktů v této lokalitě. Vejce byla pravděpodobně využívána zejména pro zpestření tehdejšího jídelníčku. Samozřejmě existuje riziko, že drůbeží trus se dostal na lokalitu sekundárně někdy v poměrně nedávné době zejména ze zemědělských hnojiv. Nicméně výskyt tepelně upravených proteinů ve vzorcích je jeden z hlavních výstupů této práce, prokazuje, že drůbež byla vcelku běžnou součástí jídelníčku v období přibližně 1200–1000 let před našim letopočtem, kdy je datováno sídliště v Březnici u Bechyně. Přesvědčivé jsou zejména tepelně upravené proteiny na „pražnici“, o které se lze domnívat, že se jedná o keramiku, která sloužila k přípravě masa, případně u „kamenné podložky“ a misky. V těchto případech lze obtížně argumentovat, že by mohlo jít o kontaminaci z pozdější doby. O tom se dá uvažovat u výplní žlabů, kde však výsledky stejně ukazují na drůbeží trus. Tím by se chov drůbeže v Čechách a snad i ve střední Evropě posunul z 9. století př.n.l. (lokalita Ostrov u Záp v okrese Praha-východ) (Kyselý 2010) na dobu o sto až tři sta let dřívější. Protože drůbeží kosti mají menší naději na zachování, bylo vhodné test vyzkoušet i na další keramice z doby bronzové, ne pouze na mladší, ale i na keramice ze střední a starší doby bronzové, popřípadě i na eneolitické. Pak by se určení širšího používání drůbeže na sídlištích v minulosti posunulo od



hypotéz na pole důkazů. Avšak musíme se zatavit i u poněkud matoucího výsledku, kdy byly vařené drůbeží proteiny identifikovány v hloubce 30 cm v zemině, je však možné, že tam místní obyvatelé prostě vylili už nepoživatelnou drůbeží polévku.

Zastavme se ještě u nově použité metodiky. Mimo informací o výskytu některých proteinů (obilí, vejce, hovězí a mléko) na archeologické keramice tato práce přináší i inovativní postup při rozlišování drůbežích proteinů od trusu těchto živočichů. Tato metodika zkoumání proteinů byla přejata zejména z kvalifikační práce Slaná (2018), ale také například z publikace Pavelka et al. (2020). Potvrdil se předpoklad využitelnosti kitu na protilátky od firmy Neogen (kit BioKits for Speciation Identification), který lze úspěšně využívat k detekci archeologických denaturovaných proteinů od *Sus scrofa* (prase, vepřové). Jelikož proteiny, vyskytující se v trusu těchto zvířat pocházející z takzvané mukózní sliznice nacházející se ve střevech, nereagují bez předešlé denaturace ve formě převaření (povaření). Firma, která vyrábí tento protilátkový kit (kit BioKits for Speciation Identification) doporučuje denuraci formou povaření při 100 °C, a to po dobu nejméně 15 minut, aby byly proteiny ve vzorku jednoznačně tepelně upraveny (denaturovány) a kit fungoval, detekoval příslušné proteiny. Ovšem v této práci je používána metoda, kdy se nejprve provede otestování vzorků před povařením, a ještě jednou po povaření dle zadání (návodu) k danému kitu. Důvodem je snaha odlišit historicky denaturované proteiny od proteinů pocházejících z odpadu nebo trusu testovaných zvířat (Slaná 2018; Pavelka et al. 2020). Proteiny reagující před povařením při 100 °C jsou poté jednoznačně historicky denaturované proteiny, tedy byly tepelně upraveny už v minulosti a ty proteiny, které reagují až po novodobém povaření musí být tedy ty proteiny pocházející z trusu zvířat či z jiného odpadu po nějakém zpracování. Proteiny z trusu zvířat jsou tedy pravděpodobně nevyužité proteiny ze střev z mukózní sliznice. Následné porovnání získaných dat nám prokazuje, zda došlo ke kontaminaci keramických vzorků a případně půdy (Slaná 2018; Pavelka et al. 2020). Testování protilátkami se provádí ve speciálních plastových titračních jamkách, které umožňují na spektrofotometru spolehlivě rozlišit intenzitu reakce (Hons 2020). Tato metodika testování byla využita jak u vzorků, které byly testovány na drůbeží proteiny, tak i u vzorků testovaných na vepřové proteiny. Výsledky prokazují, že tuto metodu analyzování archeologických vzorků je možné využít na pravěkou keramiku (doba bronzová) a z tohoto důvodu i na středověkou případně i mladší keramiku. Dále bylo prokázáno, že je možné této

metody systému antigen-protilátka využít na nepovařené a následně povařené vzorky a tím dospět i k odhalení kontaminací v testovaných vzorcích, což povede k utvoření lepší a přesnější představy o jídelníčku lidí v minulosti.

Výsledky dokazují, že tato metodika je vhodnější pro testování archeologické keramiky než hmotnostní spektrometrie, protože ta není schopna původ proteinů nijak diferencovat, což může někdy vést k mylným hypotézám či falešným výsledkům. Jeden z hlavních problémů s detekováním proteinů historického původu je právě kvůli proteinům pocházejícím z trusu, který je velmi koncentrovaně zastoupen v krajině a je dosti pravděpodobně roznášen vodní i větrnou erozí zejména z polí, kam se dostává ze zemědělských hnojiv. V současném zemědělství se používá hnojiv z různého zvířecího trusu v poměrně velké míře. Díky hnojivům ve formě zvířecího trusu doplňují do půdy potřebný dusík, fosfor a další stavební prvky. Pomocí vody jsou proteiny z trusu často roznášeny i do hlubokých vrstev půdy a spodních vod. Velmi často je najdeme dokonce i na skalách v jejich blízkosti se vyskytují nějaké zemědělské půdy.

Problémy této metody však nastávají u testování vařených (denaturovaných) a nevařených (nedenaturovaných) archeologických vzorků na hovězí proteiny (kravské maso, skotu *Bos primigenius*). Tento problém nastává u kitu (kit BioKits for Speciation Identification), jež byl využíván na drůbeží a vepřové proteiny z masa či trusu od firmy Neogen.

V této práci bylo provedeno i několik analýz na přítomnost proteinů skotu, výsledky byly jako téměř vždy pozitivní. Od těchto analýz bylo víceméně upuštěno. Jelikož tyto proteiny skotu se nachází téměř všude jelikož se využívá hnůj skotu pro hnojení velmi hojně, a hlavně v dlouhodobém měřítku, což vede k pozitivě protilátkových testů u drtivé většiny historické keramiky (Pavelka in prep. – ústní sdělení). K této pozitivě však nedochází vždy a všude. Záleží také na geografických podmínkách, jelikož například u vzorků z mladší doby bronzové (neolitu) z území dnešní Sýrie k této falešné pozitivě nedocházelo. To si lze vysvětlit tím, že v těchto místech zřejmě nedocházelo v minulosti k hnojení v takové míře případně docházelo ke hnojení trusem jiných zvířat a ne skotu (Klaisnerová 2020). Vyřešení problému týkajícího se falešné positivity na hovězí proteiny by bylo možné vyřešit úpravou metodiky testování vzorků případně přípravou jiných protilátek pro testování. Ovšem jedná se o komerčně připravované protilátky tudíž způsob jejich přípravy není znám. Stejně tak není známo přesné složení tepelně stabilních proteinů, které jsou pro přípravu těchto

protilátek využívány, jelikož se ta to vztahuje firemní tajemství a je nemožné se to od nich dozvědět. Tudíž je možné pouze na slepo předpokládat, které proteiny mohou být využívány podle jejich konkrétních termostabilních vlastností. Je pravděpodobné, že s přihlédnutím k jejich vlastnostem se bude jednat zřejmě o nějaké albuminové látky (albuminy). Použité kity od firmy Neogen jsou koncipovány na analýzu tepelně upravených bílkovin, a nikoliv na nedenaurované, tudíž jsou vhodné k detekci archeologických proteinů z historické keramiky, ale musí být současně tepelně upravené. Bohužel to neplatí pro protilátky na detekci proteinů skotu, kde protilátky reagují stejně na tepelně denaurované i tepelně nedenaurované. Proto nelze odlišit proteiny podle původu. Ne všechny komerčně připravované kity s protilátkami na denaurované bílkoviny reagují tak dobře a na tento typ vzorků a detekci proteinů v nich není vhodné používat. Například proteiny vyráběné firmou ELISA – TEK se ukázaly jako nevhodně využitelné pro analýzy tohoto rázu (Pavelka et al. 2016; Pavelka et al. 2020).

Další potenciální překážkou, kterou jsme se snažili vyřešit a byla již zmíněna výše byla potenciálně možná denaturace proteinů vlivem kompostování. Tento problém se řešil zejména kvůli potenciálně vysokým teplotám, které se v kompostu mohou vlivem biologických, chemických a fyzikálních jevů objevovat. Je známo, že teplota v kompostu může dosahovat až 65 °C (Xu et al. 2009), proto se také doporučuje kompost v horkých dnech prolévat vodou. Aby se zjistilo, zda k denaturaci proteinů vyskytujících se v trusu může docházet i v kompostu, tak byla provedeno kontrolní měření drůbežního trusu a následně drůbežního trusu, který byl vystaven teplotám 65 °C po dobu celých 24 hodin. Výsledky této kontroly jsou zaneseny v tabulce s výsledky viz výše. Tato kontrola vyšla jako negativní, takže proteiny vystavené těmto teplotám nepodléhají takové denaturaci, aby je následně využívané protilátky zachytávaly a následně došlo k jejich detekci.

Na závěr se zkusme zamyslet nad problémem záhadných žlabů. Většina studií, co se zabývaly žlaby přišla s nějakou teorií, proto by tato práce neměla být výjimkou. Co říkají současné teorie? Jako méně pravděpodobné se uvádí souvislost s hrncířstvím, protože se ve žlabech nalézají množství keramiky (nad 1000 zlomků), nicméně je možné rozeznat, že keramika byla do žlabů vložena už ve zlomcích, tedy šlo ve značné míře o střepy (Kuna et al. 2012; Kuna a Němcová v tisku). Podle předkládaných výsledků se však mezi keramickými zlomky dají nalézt zbytky potravin, což je další argument zpochybňující primární výrobu

keramiky. Další teorie je, že sloužili k různému sušení, či ukládání odpadů. Sušení čehokoliv mezi hromadou střepů se nezdá příliš pravděpodobné, k odpadu se ještě vrátíme. Protože se ve žlabech našly také závaží používané ke tkalcovství, přišli Trnka a Přemyslovská (2013) s myšlenkou, že uvnitř žlabů se tkalo, tato teorie vypadá neatřele, ale žlaby byly asi mimo domy, i když byly zřejmě zastřešené, a hlavně příliš není jasné proč by ke tkaní bylo třeba vykopat žlab, zaplnit ho keramickými zlomky a na nich tkát. Vencel (2016) uvažuje o zápalných objektech související s kultem, keramika je podruhé přepálená, objekty se vyznačují charakteristikami, které dokazují, že tam hořel oheň. V určitém podobném duchu také uvažuje Kuna a Němcová (v tisku) a také Kuna et al. (2012), když argumentují, že mohli obyvatelé chápat domy jako živé bytosti a žlaby sloužily k jejich pohřbu. Hlavní argumentem má být, že kdyby existovaly dlouhodobě a byly mimo zastřešení, byly by rozeznatelné splachové vrstvy a šlo by rozeznat stopy periodického zaplavení vodou, což není, a to potvrzuje i mikromorfologická analýza. Jenže ony asi zastřešené byly. Lze dohledat, že jinde se žlaby často vyskytují uvnitř kůlových staveb, a to v jejich severovýchodním rohu (*Geck a Seliger 1991*), není jasné, jak byly kůly vysoké, ale lze si představit, že byly vysoké natolik, aby střechu nezapálil oheň uvnitř žlabů, navíc oheň mohl být i regulovaný, aby se právě zapálení stropu zabránilo. Takže hlavní argument pro to, že nejsou splachové vrstvy padá, objekty byly zřejmě zastřešeny, možná měly i dřevěné stěny. Proto i závěr na základě tohoto konstatování, že protože se jedná o jednorázový, nezvrstvený charakter výplní existuje jediná možnost, jak tento jev vysvětlit, totiž ta, že žlaby vznikly dodatečně, až po spálení domů, a byly rychle zaplněny během závěrečné části pohřebního rituálu (Kuna a Němcová v tisku) je nevěrohodný. Navíc ve žlabech je převážně keramika a potravní zbytky, nikoliv rum ze spáleného domu. Náboženský charakter pro „pohřbívání domu“ se zakládá pouze na spekulacích. Citovaný text z *Harrise a Cipolla (2017)*, že bychom měli „přestat se ptát, proč lidé v minulosti (mylně) věřili v to, že stromy mají duši a lidé se mohou změnit v jaguára, a začít se ptát, jaký to byl svět, ve kterém stromy duši měly a lidé se v jaguára měnili“ (Kuna a Němcová v tisku). Podle těchto názorů, bychom měli „uvažovat o minulém světě nikoli jako jiném (chybném) pohledu na známou realitu, ale jako o jiné realitě“ (Kuna a Němcová v tisku). Zdá se, že autoři nemají moc jasno, co je vlastně šamanské vidění světa. I citace *Harrise a Cipolla* představuje vulgární a zjednodušené interpretace, tedy výklad, který asi nepodávají přímo samotní šamani. Šaman řekněme může vstoupit do vědomí jaguára, může se stát jaguárem v šamanském světě, ale nikoliv

v tomto světě (Eliade 1995, 1997), navíc jak to souvisí s představou „živého domu“? Také je poněkud zvláštní proč by dům umíral, znamená to odchod obyvatel, nebo stavbu jiného domu? Pravděpodobnější je zcela praktický význam žlabů. Navíc knovízská kultura se považuje za indoevropskou. Z indoevropských náboženských představ a mytologie se zachovalo hodně zejména z Řecka, z Indie (védy), případně z germánského prostředí, nějaké informace máme i z keltského a ze slovanského náboženského myšlení, i když z našeho slovanského jsou to informace velmi kusé mnohdy spíše na úrovni démonolatrie. Nikde není známo nic, o tom, že by běžné domy byly považovány za živé. Pokud autoři zaznamenali někde informace v indoevropských náboženských představách, že něco takového existovalo, měli by to uvést. Není příliš jisté, zda obyvatele můžeme zařadit mezi Protokelty, nicméně je tu určitá pravděpodobnost, že ano. V náplni žlabů není nic cenného, kdyby se mělo jednat o pohřeb, mohli bychom očekávat asi nějaké milodary. O pohřbech u Keltů jsme informováni, i když informace pochází z pozdější doby a je geograficky vzdálenější. Caesar píše: „pohřby jsou ve srovnání s galským způsobem života nákladné a velkolepé. Všechno, o čem se ví, že bylo nebožtíkovi za života drahé, pozůstali házejí do ohně, dokonce i zvířata, a ještě nedávno byli po ukončení pohřebních obřadů upalováni i otroci a poddaní, které měl mrtvý v oblibě“ (Caesar 2009). Tudíž není ani pravděpodobný „pohřeb domu“. Co žlaby připomínají? Asi opravdu nejvíce ukládaní odpadu, hypotézu, která není příliš populární. Nicméně např. obilí, bylo nalezeno jen v jednom vzorku, za to silně, mléčný kasein někde silně jinde vůbec, živočišné proteiny a proteiny trusu prakticky všude, ale ty může do určité míry roznášet spodní voda, a všude je spousta keramiky ve formě střepů. Ostrůvkovité nálezy potravin svědčí spíš pro určitá místa, kde byl vyhozen konkrétní odpad. Informace, že podle jednolitého charakteru výplní, byly žlaby zaplněny rychle a najednou (Kuna a Němcová v tisku), je zpochybněna tím, že objekty byly zřejmě zastřešeny, proto tam nejsou vidět stopy po dešťové vodě. Je možné, že obyvatelé této kultury měli vedle domů odpadní jámy, pro určitý typ odpadu, které byly u jiných kultur situovány jinak a občas je zapálili, aby se zbavili zápachu, který doprovází rozklad organických zbytků. Zastřešení bylo nutné, protože déšť by mohl vést k obnovení rozkladu mírně přepálené organiky a ta by opět zapáchala.

## 7. Závěr

V této studii (diplomové práci) se podařilo identifikovat řadu proteinů (bílkovin) z různých artefaktů ze sídliště z mladší doby bronzové a byl učiněn pokus tyto výsledky interpretovat v biologických a archeologických souvislostech. První zkoumané artefakty popsané jako „kamenné podložky“ byly určeny jako něco, kde se mohlo jídlo skladovat, ale zřejmě se tam nepřipravovalo, protože sice obsahovaly tepelně upravené (denaturované) proteiny prasat (*Sus scrofa*) a drůbeže (*Gallus gallus*), ale ne ve všech odebraných vzorcích a většinou o nízkých koncentracích, nicméně se na nich ve dvou ze tří případů silněji projevil gliadin jako protein z obilnin. Objekty označené jako „pražnice“, vykazují nulovou přítomnost obilnin, naopak silnou přítomnost tepelně upravených proteinů prasat a drůbeže, proto se lze domnívat, že se nejedná o skutečné „pražnice“, ale o nějakou historickou keramiku, která sloužila k úpravě masa. „Žlabovité objekty“ vykazovaly ostrůvkovitě všechny testované proteiny a také drůbeží trus. Domnívám se, že nejde o „pohřeb domu“, jak uvádí jedna z posledních hypotéz, protože klíčový důkaz pro tuto hypotézu založený na poznatku, že se do žlabů nedostávala dešťová voda, vidím jako velmi nepřesvědčivý, ale přikláním se k jedné z původních tezí, že jde o poněkud specifické skládky odpadu, které byly zastřešené a pravděpodobně jednou za čas i zapalovány (kvůli zbavení zápachu). Další testovaný objekt „miska“ vykazuje tepelně upravené proteiny pro drůbež a silné zastoupení trusu prasat a drůbeže. Zřejmě jde o proteiny ze zeminy, kde byla po dlouhá léta uložena. Jako jeden z hlavních výstupů práce považuji důkaz existence drůbeže, (především tepelně upravené proteiny na „pražnicích“), na sídlišti z mladší doby bronzové, tím se posouvá chov drůbeže na území Čech o 100 až 300 let více do minulosti, než se dosud předpokládalo na základě studií osteologického materiálu z jiných lokalit.

## 8. Shrnutí

Tato archeologicko-biologická diplomová práce navazuje na publikace dalších autorů v tomto oboru a částečně také na moji vlastní bakalářskou práci z roku 2020. Mezi hlavní části této práce je charakteristika výplní různých objektů a následná interpretace, jaké pochody s největší pravděpodobností vedly k tvorbě materiálu, který byl v objektech uložený a tím přispět k debatě o původu vzniku a funkci zkoumaných žlabovitých objektů, které se nalézaly na lokalitě Březnice u Bechyně z mladší doby bronzové. Historická keramika byla testována na přítomnost různých proteinů vyskytujících se v potravinách. Testovány byly proteiny charakterizující vejce, kuřecí maso, vepřové maso, hovězí maso, mléko a obilí. Další částí této práce bylo také prokázání využitelnosti testování historické keramiky za pomoci metody antigen-protilátka, která je schopná odlišit vařené proteiny od proteinů pocházejících z pozdější kontaminace, což se podařilo prokázat. Další výstup této práce je důkaz existence drůbeže na sídlišti z mladší doby bronzové. To posouvá chov drůbeže na území Čech o jedno až tři století více do minulosti, než se dosud předpokládalo na základě studií osteologického materiálu z jiných lokalit.

## 9. Resumé

This (represented) archaeological and biological master thesis is based on publications of following (previously mentioned) authors in this Scientific field and partly on my own bachelor thesis from the year of 2020. Among the most vital parts of the graduation project is the filling of different objects and following interpretation of the processes, which caused the creation of the material storing in those objects and contributes to discussions about the origin and functions of examined prolonged, narrow objects located in the area of Březnice u Bechyně from the Late Bronze Age. Historical pottery was tested on presence of different proteins occurring in different groceries. Proteins characterizing (contained in) eggs, chicken, pork, beef, milk and grain were tested. The next part of the work was to demonstrate utility/benefits of testing historical ceramics using the antigen-antibody

method which is able to distinguish cooked proteins from proteins derived from later contamination, which has been demonstrated. Another output of this work is proof of the existence of poultry in a settlement from the Late Bronze Age. This pushes poultry farming in Bohemia one to three centuries more into the past than previously thought on the basis of studies of osteological material from other localities.



## Seznam literatury

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

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

Asara, J. M., Schweitzer, M. H., Freimark, L. M., Phillips, M., Cantley, L. C. 2007. *Protein sequences from mastodon and Tyrannosaurus rex revealed by mass spektrometry*, *Science*, 316, 280–285.

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

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

Bednář, P., a Kučera, L. 2021. *Moderní chemická analýza v archeologii I. díl*. Univerzita Palackého v Olomouci, 295 s.

Benecke, N. 1993. *On the utilization of the domestic fowl in Central Europe from the iron age up to the middle ages*. *Archaeofauna*, 2: 21-31.

Benecke, N. 1994a. *Archäozoologische Studien zur Entwicklung der Haustierhaltung in Mitteleuropa und Südkandinavien von den Anfängen bis zum ausgehenden Mittelalter*. *Schriften für Ur-und Frühgeschichte* 46. Deutsches Archäologisches Institut, Berlin, 451 pp

Benecke, N. 1994b. *Der Mensch und seine Haustiere. Die Geschichte einer jahrtausendealten Beziehung*. Konrad Theiss Verlag, Stuttgart, 470 pp

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

Boatman, E. M., Goodwin, M. B., Holman, H. N., Fakra, S., Zheng, W., Gronsky, R., Schweitzer, M. H. 2019. *Mechanisms of soft tissue and protein preservation in Tyrannosaurus rex*, *Sci. Rep.* 9, 15678.

Boev, Z. 1995. *On the appearance of the domestic fowl (Gallus gallus domestica) in Bulgaria and Balkan peninsula and the question of domestication of junglefowls (genus Gallus BRISSON, 1760) in southeast Europe*. *Historia naturalis bulgarica*, 5: 37-50.

Bouzek, J. 2004. *Die Kimmerier und Mitteleuropa*, pp. 375-384. [In:] Kazdová, E., Měřínský, Z., Šabatová, K. (eds) – *K počtě Vladimíru Podborskému*. Ústav archeologie a muzeologie, Filosofická fakulta Masarykovy university, Brno, 530 pp.

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

Burčák-Abramovič, N. I. a Mežlumjan, C. K. 1986. *K vidovomu sostavu, rasprostranjeniju i ispol'zovaniju ptic v golocene*. *Zoologičeskij Sbornik (Erevan)*, 20: 128-149. (In Russian).

Caesar, G.I. 2009. *Zápisky o válce galské. překlad: Jan Kalivoda*. vydavatel: nakladatelství NAŠE VOJSKO, s. r. o. ISBN: 978-80-206-1403-2 konverze, EPUB: em verze: 2016.01.24

Cammack, R., et al. 2006. Oxford dictionary of biochemistry and Molecular biology. Revised edition, Oxford iniversity press. 736 s.

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

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

Cramp, L. J. E., Jones, J., Sheridan, A., Smyth, J., Whelton, H., Mulville, J., Sharples, N. a Evershed, R. P. 2014. *Immediate replacement of fishing with 39 dairying by the earliest farmers of the northeast Atlantic archipelagos*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 281, 1-8.

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

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

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

Eliade, M. 1995. *Dějiny náboženského myšlení*. Sv. I–IV. OIKOYMENH. ISBN 80-238-0470-7 // ISBN 80-86005-19-4 // ISBN 80-86005-53-4 // ISBN 978-80-7298-281-3

Eliade, M. 1997. *Šamanismus a nejstarší techniky extáze*. Argo ISBN 80-7203-153-8

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

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

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

Geck, S. a Seliger, Ch. W. 1991. *Die urnenfelderzeitliche Siedlung von Straubing-Öberau*, Das Archäologische Jahr in Bayern 1990, 47–50.

Harris, O. J. T., a Cipolla, C. N. 2017. *Archaeological theory in the new millennium*. Introducing current perspectives. London – New York.

Hons, M. 2020. *Detekce mléčných a dalších proteinů na archeologické keramice*. Bakalářská práce, Západočeská univerzita v Plzni. 50 s. Plzeň.

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

Chvojka, O., a Šálková, T. 2010. *Březnice u Bechyně K interpretaci sídelního areálu z mladší doby bronzové se žlabovitými objekty*. Příspěvky z XI. Konference Příbram 7.-10.9. 2010. 127 s.

Chvojka, O., Kuna, M., Křivánek, R., Menšík, P., Šálková, T. 2019. *Weaving looms, Intentional Demolitions, Burnt Offerings...? Trenchlike Features of the Urnfield Period in Central Europe*. Archäologisches Korrespondenzblatt 49/3, 321–340.

Chvojka, O., Kuna, M., Menšík, P., Křivánek, R., Němcová, A., Šálková, T., Beneš, J., Budilová, K., Kloužková, A., Koník, P., Kovárník, J., Majer, A., Metlička, M., Novák, J., Pavelka, J., Prokop, V., Strouhalová, B., Šída, P., Zuber, J. 2021. *Rituály ukončení a obnovy. Sídliště mladší doby bronzové v Březnici u Bechyně*. České Budějovice, Praha, Plzeň, 368 s. (v tisku)

Chvojka, O., Hlásek, D., Šálková, T. 2021b. *Jižní Čechy v kontextu středoevropské doby bronzové*. In: Vondrovský, V., Chvojka, O., (eds.), *Pravěké komunity vnitřní periferie. Vývoj osídlení jižních Čech od 9. do počátku 1. tisíciletí př. Kr.* České Budějovice, 193–196.

Järvinen, K.M., Beyer, K., Vila, L., Bardina, L., Mishoe, M., Sampson, H.A. 2007. *Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy*. *Allergy*. 62 (7): 758–65.

Jiráň, L. (ed.) 2008. *Archeologie pravěkých Čech 5 – Doba bronzová*. Archeologický ústav Akademie věd České republiky, Praha, v. v. i., Prague, 265 pp.

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

Karchu, A. A. 1990. *Srednegolocenovye pticy iz archeologičeskich pamjatnikov Podmoskov'ja*. *Ornitologija*, 24: 67-71. (In Russian with English summary).

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

Klaisnerová, M. D. 2020. *Biologická analýza archeologických vzorků z předního východu*. Bakalářská práce, Západočeská univerzita v Plzni. Plzeň.

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

Kuna, M., Němcová, A., Gentizon-Haller, A. L., Haller, M., Hanykýř, V., Kloužková, A., Kočár, P., Kovačiková, L., Malyková, D., Mazač, Z., Slabina, M., Tempír, Z., Vařeka, P., Vlčková, Z., Zemenová, P. 2012. *Výpověď sídlištního odpadu. Nálezy z pozdní doby bronzové v Roztokách a otázky depoziční analýzy archeologického kontextu*. Praha. 172–205.

Kyselý, R. 2010. *Review of the oldest evidence of domestic fowl Gallus gallus f. domestica from the Czech Republic in its European context*. Acta Zoologica Cracoviensia - Series A: Vertebrata, Volume 53, Numbers 1-2, July 2010, pp. 9-34(26)

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

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

Lindgren, J., Sjövall, P., Thiel, V., Zheng, W., Ito, S., Wakamatsu, K., Hauff, R., Kear, B. P., Engdahl, A., Alwmark, C., Eriksson, M. E., Jarenmark, M., Sachs, S., Ahlberg, P. E., Marone, F., Kuriyama, T., Gustafsson, O., Malmberg, P., Thomen, A., Rodríguez-Meizoso, I., Uvdal, P., Ojika, M., Schweitzer, M. H. 2018. *Soft-tissue evidence for homeothermy and crypsis in a Jurassic ichthyosaur*, Nature, 564, 359–365.

Lineweaver, H., a Murray, C.W. 1947. *Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid*. The Journal of Biological Chemistry. 171 (2): 565–81.

MacDonald, K. C. 1993. *Chickens in Africa: the importance of Qasr Ibrim*. Antiquity, 67: 584-590.

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

Mlíkovský, J. 2002. *Cenozoic birds of the world*. Part 1: Europe. Ninox Press, Prague, 406 pp.

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

Nauerth, C. 1986. Hahn, S. V. [In:] *Real Lexikon für Antike und Christentum*, Band XIII, pp. 360-372

Organ, C. L., Schweitzer, M. H., Zheng, W., Freemark, L. M., Cantley, L. C., Asara, J. M. 2008. *Molecular phylogenetics of mastodon and Tyrannosaurus rex*, *Science*, 320, 499.

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.

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

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

Pavelka, J., Smejda, L., Hynek, R., Kučková, S. 2016: *Immunological detection of denatured proteins as a method for rapid identification of food residues on archaeological pottery*. *Journal of Archaeological Science* 73, 25-35. IF 2,255

Pavelka, J., Šmejda, L., Kučková, Š., Menšík, P. 2020. *Challenge to molecular archaeology Sediments contaminated by allochthonous animal proteins*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, roč. 43, č. 19-20, s. 863-874. ISSN 1082-6076.

Peške, L. 1994. *The history of natural scientific methods in the archaeological institute and their present objectives*. Památky archeologické – Supplementum 1: 259-278.

Plet, C., Grice, K., Pagès, A., Verrall, M., Coolen, M. J. L., Ruebsam, W., Rickard, W. D. A., Schwark, L. 2017. *Palaeobiology of red and white blood cell-like structures, collagen and cholesterol in an ichthyosaur bone*, Sci Rep. 7, 13776.

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

Rimphanitchayakit, V., a Tassanakajon, A. 2010. *Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors*. *Developmental and Comparative Immunology*. 34 (4): 377–86.

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

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

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



Stevens, L. 1991. *Genetics and evolution of the domestic fowl*. Cambridge University Press, Cambridge, 324 pp.

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

Šálková, T., Bezděk, A., Březinová, H., Farkašová, K., Houfková, P., Chvojka, O., John, J., Kmošek, J., Koník, P., Kovačiková, L., Michálek, J., Msallamová, Š., Novák, J., Pavelka, J., Šuláková, H., Bešta, T., Myšková, E., Weiter, L., Zronek, P. 2015. *Bioarchaeological reconstruction of the funeral rite-case study based on organic material from the Hallstatt Period tumulus at the site Zahrádka (South Bohemia, Czech Republic)*, *Památky archeologické* 106, 95–135.

Teichert, M. a Lepiksaar, J. 1977. *Die Vogelknochen aus den urgeschichtlichen Kulthohlen des Kyffhäusergebirges. Alt-Thüringen*. Jahresschrift des Museums für Ur-und Frühgeschichte Thüringens Weimar, 14: 108-144.

Tixier-Boichard, M., Bed'hom, B., Rognon, X. 2011. *Chicken domestication: from archeology to genomics*. *C R Biol. Mar*;334(3):197-204. doi: 10.1016/j.crv.2010.12.012. PMID: 21377614.

Trnka, R. a Přemyslovská, P. 2013: *Zamyšlení nad tkalcovským stavem, Živá archeologie – Rekonstrukce a experiment v archeologii* 15, 54–60.

Ullmann, P.V., Macauley, K., Ash, R.D., Shoup, B., Scannella, J. B. 2021. *Taphonomic and Diagenetic Pathways to Protein Preservation, Part I: The Case of Tyrannosaurus rex Specimen MOR 1125*. *Biology (Basel)*. Nov 17;10(11):1193. doi: 10.3390/biology10111193. PMID: 34827186; PMCID: PMC8614911.

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

Vencl, S. 2016. *Pravěké zápalné oběti: případ knovízských objektů z Prahy 9 – Běchovic*. Archeologie ve středních Čechách 20. 277-305.

West, B., Zhou, B. X. 1988. *Did chickens go north? New evidence for domestication*. Journal of Archaeological Science, 15: 515-533.

Xu, W., Reuter, T., Inglis, G.D., Larney, F.J., Alexander, T.W., Guan, J., Stanford, K., Xu, Y., McAllister, T.A. 2009. *A biosecure composting system for disposal of cattle carcasses and manure following infectious disease outbreak*. J Environ Qual. Feb 6;38(2):437-50. doi: 10.2134/jeq2008.0168. PMID: 19202014.

Zeuner, F. E. 1963. *A history of domesticated animals*. Hutchinson & Co. Ltd., London. 560 pp.

## Internetové zdroje

[1] <https://conquerscientific.com/lab-equipment/mass-spectrometers-lcms-systems/>

[2] [https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10021/9j1035a-biokit-cooked-species-id\\_902011q\\_kitinsert.pdf](https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10021/9j1035a-biokit-cooked-species-id_902011q_kitinsert.pdf)

## Seznam obrázků

Obr. 1. Schématický průběh takzvaného ELISA testu.....	12
Obr. 2. Vysvětlivka k Tab. 1.....	26
Obr. 3. Vysvětlivka k Tab. 1.....	26

## Seznam Tabulek

Tab. 1. ELISA testy na proteiny z potravin z archeologických vzorků.....	25
--	----