

DETEKCE STOP MLÉKA V PORÉZNÍ KERAMICE Z NEOLITU JIHOZÁPADNÍCH ČECH A OTÁZKA TRÁVENÍ LAKTÓZY U EVROPSKÝCH POPULACÍ V MINULOSTI*

Monika Číperová, Jaroslav Pavelka & Ladislav Šmejda**

Abstract: *The authors of this study focus on analyses of milk traces preserved in the form of organic residues on potsherds dated to the Neolithic and later periods. Commercial immunological tests for analyses of protein allergens in cooked food were used to detect milk remains. By using this approach, it was possible to determine the type of milk used in cooking, and specifically that some Neolithic pots from the Czech Republic contained bovine milk, whilst others were used for goat milk. The abundance of milk in the human diet requires the ability to digest it. This ability is not distributed evenly across past and present populations. We therefore conclude with a discussion of the current state of knowledge in this field of research.*

Key words: *milk remains, pottery, immunodetection, ELISA, lactose intolerance.*

*Vznik tohoto článku byl podpořen projektem Fakulty životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze s názvem Environmentální aspekty udržitelného rozvoje (IGA FES 4290013123166) a projektem Západočeské univerzity v Plzni s názvem Aplikace nových technologií v archeologii (SGS-2014-017). Autoři článku děkují Mgr. Tereze Šálkové a dvěma anonymním recenzentům za cenné připomínky ke starším verzím článku.

**Mgr. Monika Číperová, Katedra archeologie, Fakulta filozofická ZČU, pacalis@seznam.cz; Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D., Centrum biologie, geověd a envigogiky, ZČU a Katedra archeologie, Fakulta filozofická ZČU, japetos@seznam.cz; PhDr. Ladislav Šmejda, Ph.D., Výzkumné centrum nových technologií, ZČU, Katedra archeologie, Fakulta filozofická ZČU a Katedra ekologie, Česká zemědělská univerzita, ladislav.smejda@me.com.

1. ÚVOD

Výzkum keramiky je v archeologii jedním z důležitých pilířů poznání minulosti. Ovšem výzkumy byly donedávna zaměřeny pouze na její formální aspekty, především tvar a výzdobu, případně na technologii výroby. Teprve v posledních letech se otvírají možnosti jak zkoumat i pozůstatky stravy, nápojů či jiných látek, které byly v keramice uchovávané (Copley et al. 2005a; Craig et al. 2004; Cramp, Jones et al. 2014). V současnosti se výzkum zaměřuje na různé otázky, ale jedním z hlavních směrů je identifikace pozůstatků mléka v keramické hmotě, především v období začátků zemědělství (Craig et al. 2011). Nedávné výzkumy (Gamba et al. 2014), stejně jako starší (Burger et al. 2007), poukazují na základě analýzy archaické DNA (ancient DNA, aDNA) na to, že neolitičtí zemědělci nedokázali po dosažení dospělosti trávit mléčný cukr laktózu. To neznamená, že by pro ně konzumace syrového mléka, tj. mléka nezpracovaného do formy vhodného mléčného výrobku, byla vyloženě škodlivá. Mohla ale, v závislosti na osobních predispozicích a množství zkonsumovaného mléka, způsobovat nepříjemné zažívací obtíže a nutriční hodnota mléka by nebyla efektivně využita.

V keramice mladší a pozdní doby kamenné jsou nicméně stopy mléka prokazatelné. Nejstarší využití keramických nádob pro skladování a zpracování mléka je známo z Blízkého východu a Balkánu, což se podařilo doložit chemickou analýzou velkého souboru archeologických nálezů datovaných do období mezi 7. a 5. tisíciletím př. Kr. (Evershed et al. 2008). Tyto výsledky jsou v souladu s již dříve zjištěnými stopami mléka na neolitické keramice z Maďarska a Rumunska, datované do 1. poloviny 6. tisíciletí př. Kr. (Craig et al. 2005). Na území u západního pobřeží Baltského moře a na Britských ostrovech jsou nejstarší doklady použití keramických nádob pro mléčné produkty datovány do 4. tisíciletí př. Kr. (Craig et al. 2011), takže získaný obraz dobře odpovídá modelu postupující neolitizace z Blízkého východu do severozápadní Evropy. Stopy mléka byly bezpečně zjištěny i v keramice pasteveckých kultur 5. tisíciletí před Kr. z libyjské Sahary (Dunne et al. 2012). V Čechách jsme měli doposud pozitivní výsledky jen pro střední eneolit (John a Pavelka 2010), starší keramika ovšem nebyla testována. V neolitu je spotřeba mléka obecně předpokládána, neboť patří mezi tzv. sekundární produkty domestikovaných zvířat, mezi něž se řadí mléko, vlna, tažná síla, jízda a hnůj (Halstead a Isaakidou 2011; Kovacikova et al. 2012).

Tato zjištěná se tedy zdají být v protikladu k výše uvedeným závěrům genetických výzkumů, které u neolitických zemědělců vylučují schopnost trávit laktózu. Z toho vyvstává otázka, zda ji zemědělské populace získaly až později jako adaptaci na dobře dostupnou potravinu. Výzkum archaické DNA ukazuje, že příslušníci nejstarších zemědělských kultur se mísili s původními lovci a sběrači (Balter 2014; Rasteiro a Chikhi 2013), a to zřejmě v každém regionu specifickým způsobem. Podle starších údajů zjištěných na základě analýz mtDNA a chromozómu Y převládaly v Evropě spíše geny původních lovců a sběračů (van Oven a Kayser 2009; Richards et al. 2000; Wells et al. 2001). Je tedy pravděpodobné, že většina dospělých obyvatel Evropy v počátcích zemědělství nebyla schopna laktózu trávit, neboť tolerance laktózy v dospělosti se vyskytuje v různé míře pouze u populací, na které působil dlouhodobě selekční tlak na tuto schopnost (Itan et al. 2009; Swallow 2003). Pro

dnešní celosvětovou populaci se odhaduje, že jen asi 35 % dospělých lidí je schopno syrové mléko efektivně trávit (Witas et al. 2015). Neolitici tedy zřejmě mléko nějak zpracovávali, neboť produkty vzniklé například kysnutím, případně kvašením mléka mají výrazně snížený obsah laktózy. Vyzrálý sýr nemusí laktózu obsahovat vůbec a kysnutím se obsah laktózy v mléčných potravinách snižuje o desítky procent (k tomu v novější literatuře např. Salque 2012 a Salque et al. 2013). Výhodou těchto mléčných výrobků oproti čerstvému mléku je navíc jejich delší trvanlivost a lepší skladovatelnost, což umožňuje brát tyto potraviny s sebou na cesty nebo je směňovat za nějakou protihodnotu (Halstead a Isaakidou 2011).

V této práci se zaměřujeme na otázku, nakolik je mléko prokazatelné v keramických nádobách z neolitu na našem území a z jakého druhu chovaných zvířat případně pochází. Podstatným předpokladem je však vypracování metodiky, na jejímž základě by toto určování bylo možné. Předchozí analýzy zbytků potravin na keramice z našeho území se zaměřovaly na stopy, které byly makroskopicky jasně patrné – tj. na karbonizované „příškvarky“ (Pavelka a Orna, 2011; Pavelka a Vařeka, 2008), těch se ale nachází poměrně málo. Je proto nutno vypracovat metody, které by umožnily detekovat i mikroskopické/molekulární stopy potravin, dochované přímo v porézní keramické hmotě (srov. Copley et al. 2005a; Copley et al. 2005b). Běžně se pro náš neolit předpokládá využívání kravského mléka, neboť kosti skotu v archeologických souborech obvykle početně dominují (Kovačiková et al. 2012). Proto jsme se zaměřili na testování přítomnosti stop kravského mléka, ale v omezené míře rovněž i mléka kozího, abychom dokázali zachytit – alespoň částečně – případnou variabilitu původu mléka. Předchozí práce původ mléka vůbec nerozlišovaly; na úrovni lipidů a jejich rozkladných produktů to ostatně ani není možné. Na testy se totiž doposud nejčastěji používá hmotnostní spektrometrie a jen v menší míře se využívá i imunologická detekce pomocí specifických protilátek, na čemž je založena naše metodika. Pokud byla v minulosti použita k detekci protilátka, jednalo se o protilátku proti mléčné bílkovině kaseinu (Craig et al. 2003), která není druhově příliš specifická, navíc se podle popisu zdá, že původní kasein použitý při výrobě protilátky jako antigen nebyl v degradované formě, v jaké se vyskytuje v archeologických nálezích. Pak nemohla být detekce příliš přesná, naopak se dají u archeologického materiálu očekávat nespecifické reakce, nebo jen velmi slabé.

Obvyklým problémem při podobných testech prováděných v minulosti na archeologickém materiálu byly tzv. křížové reakce (cross-reactions; nespecifické reakce mezi antigenem a protilátkou), jejichž následkem dochází k falešně pozitivním výsledkům (Brandt et al. 2002; Child a Pollard 1992). Tyto křížové reakce vznikají mezi protilátkou a jinými antigeny, než jsou specifické cíle, proti kterým byly protilátky vytvořeny. To se děje u proteinů v archeologickém materiálu především v důsledku fyzikálních, chemických a biologických vlivů působících v půdě, rovněž byla zaznamenána pozitivní reakce u buněčných povrchů některých půdních bakterií. Proto se ve starších pracích nejevila detekční metoda pomocí protilátek v archeologii jako vhodná. Ovšem tyto starší techniky byly původně vyvinuty pro použití na recentních biologických vzorcích, a proto mají obvykle omezenou nebo problematickou použitelnost při zkoumání archeologických zbytků. Při užití ELISA

testů mohou také hrát roli problémy s degradací proteinů, což omezuje vazbu antigenu a tak vznikají nespecifické výsledky (Dongoske et al. 2000).

To však platí ve zvýšené míře u ELISA reakcí vyvinutých na čerstvé vzorky a pak použitých na archeologický materiál. U námi použitého imunologického testu je takové riziko mnohem menší. Zde detekce počítá s identifikací zkoumané látky v potravinách, které jsou různě, zejména tepelně, upravovány. Tyto změny však vlastní identifikaci neohrožují (Björklund et al. 2001). Naopak se počítá s tím, že analyzované vzorky představují silně degradované proteiny v různě upravených potravinách, navíc ve stopovém množství. Metody používané v zahraniční archeologii standardně, jako plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry, viz např. Craig et al. 2004; Oudemans a Boon 1991) využíváme pro náš výzkum také, ale v menší míře a jen u nálezů, u kterých je podezření na další organické komponenty v keramice, a také pro verifikaci některých analýz.

Našimi imunologickými metodikami jsme schopni přesněji detekovat stopy mléka v porézní keramice a navíc určit jeho původ co se týče zvířecího druhu.

Proteiny obsažené v kravském mléce jsou typově podobné proteinům v mléce kozím (α -, β -, κ -kasein, β -laktoglobulin, α -laktalbumin aj.), ale liší se ve svých genetických polymorfismech a frekvencích zastoupení (Haenlein 2004). K rozlišení mezi proteiny kravského a kozího mléka využíváme protilátek, které detekují specifické kozí IgG (imunoglobuliny třídy G) a jiných, které jsou schopny rozeznat β -laktoglobulin skotu. Bovinní β -laktoglobulin je považován za jeden z hlavních potenciálních alergenů v mléce skotu. Jedná se o hlavní bílkovinnou složku syrovátky, přičemž její složitá molekula je velmi odolná vůči tepelnému působení i enzymatickému štěpení, proto se používá na testování přítomnosti kravského mléka v tepelně upravených potravinách a ze stejného důvodu je vhodným indikátorem i pro analýzy archeologických vzorků.

Proto bychom se v této studii chtěli zaměřit na to, jaké mléko v neolitu lze detekovat, protože to žádná z předchozích studií neřeší. Z nalezených osteologických zbytků lze sice učít, jaká domácí zvířata se na dané lokalitě chovala, ovšem nikoli, který druh mléka byl skutečně využíván či upřednostňován v kuchyňském zpracování. Mléko detekované v keramice však s vysokou pravděpodobností sloužilo k lidské výživě.

S naším výzkumem přímo souvisí otázka schopnosti mléko (respektive některé jeho složky) trávit. Jak již bylo uvedeno výše, podíl lidí, u nichž je i v dospělosti aktivní enzym zvaný laktáza, s jehož pomocí je v tenkém střevě štěpen mléčný cukr (laktóza) je v různých populacích různě vysoká. V kojeneckém věku je produkce tohoto enzymu přirozená všem, neboť je nezbytný pro získávání energie z mateřského mléka, ale ve většině světových populací (a u savců všeobecně) se v průběhu dospívání schopnost trávit laktózu (tzv. laktózová tolerance) ztrácí (v souvislosti s evropským neolitem tento jev podrobněji diskutuje Burger et al. 2007). Z dosavadních výzkumů se zdá, že nejstarší zemědělci v Evropě neměli geneticky zakódovanou perzistenci enzymu laktázy (a tedy toleranci mléčného cukru laktózy) do dospělého věku, zatímco v mladších historických obdobích je schopnost trávit mléčný cukr v některých geografických oblastech více či méně běžná. Kdy a jakými procesy některé populace perzistenci aktivní laktázy do dospělosti získali,

není doposud plně objasněno, proto na tomto poli neustále probíhá intenzivní výzkum (Witas et al. 2015). Náš příspěvek ke studiu využívání pravěké keramiky pro skladování a zpracování mléka proto doplňujeme o přehled výsledků posledních prací na téma selekčních tlaků a toků genů v evropské populaci, v důsledku kterých výrazně převážili lidé se schopností trávit laktózu v dospělém věku. Tato dvě témata totiž spolu bezprostředně souvisejí.

2. MATERIÁL A METODY

2.1. ELISA TESTY

Námi použitá metodika je zčásti založena na speciálních komerčních ELISA¹ kitech. Tyto testy jsou založené na reakci substrátu a protilátky a jedná se o precizně kalibrované, garantované reakce, které jsou určeny pro testování alergenů v potravinách, což znamená, že zachycují i nepatrné kontaminace nežádoucích proteinů, a to jim dává potřebnou citlivost i pro detekci za příznivých okolností dochovaných archeologických zbytků. Specifické protilátky jsou přichyceny na dně jamek mikrotitrační destičky a jsou schopny zachytit odpovídající proteiny ze vzorku, tato reakce je pak zviditelněna pomocí přidané biotinylované² druhově specifické protilátky a řady promývacích a barvicích roztoků. Pozitivní reakce se vyznačuje žlutým zabarvením, podobně jako pozitivní kontrola, zatímco negativní kontrola se nezbarvuje, nebo jen velmi mírně. Pro vyhodnocování je možná vizuální nebo spektrofotometrická detekce.³ V našich měřeních byla použita detekce na spektrofotometru (obrázky 1–4). Měření bylo prováděno na čtečce ELISA VERSAmaxTM (Molecular Devices). Výhoda metodiky spočívá mimo jiné v tom, že je možné ji provádět i v polních podmínkách a improvizovaných laboratořích. Na rozdíl od výzkumů pracujících s archaickou DNA existuje v případě detekce druhově specifických mléčných proteinů jen zanedbatelné riziko kontaminace vzorků personálem, neboť cílové proteiny se v lidském organismu vůbec nenacházejí. Riziko kontaminace lze tedy prakticky odstranit základní prevencí a odbíráním vzorků z vnitřní keramické hmoty a nikoliv jen z povrchu nádob či jejich zlomků.

2.2. TESTOVACÍ SADY

Testy pro určení, zda se jedná o stopy kravského mléka, se prováděly pomocí BIO-KITS BLG (β -Lactoglobulin) Assay kitu, kde se výsledek určoval na titrační destičce. Jednalo se o ELISA kompetitivní test, kde se projeví specifickým zabarvením negativní reakce. Použité soupravy pocházely od společností Neogen (dříve Tepnel *BioSystems*).

¹ELISA – zkratka z anglického termínu Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, jde o rozšířenou imunologickou metodu sloužící k detekci protilátek. ELISA využívá schopnosti proteinů vázat se na povrch umělých hmot a v druhé řadě pak schopnost vázat enzymy na části imunoglobulinových molekul.

²Biotinylace – proces vazby biotinu (vitamin H) k molekule proteinu pomocí NH₂ skupiny.

³Spektrofotometry – 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 květ s optickou dráhou 1 cm.

Obrázek 1. Odběr keramické hmoty z neumyté keramiky ml. bronz Rataje III.

Picture 1. Removing ceramic material from unwashed pottery fragment of Late Bronze Age site Rataje III.



Obrázek 2. Závěrečná fáze ELISA testu – pipetování STOP roztoku do mikrotitračních jamek.

Picture 2. Final phase of ELISA test – pipetting of STOP solution in microtiter holes.



Přítomnost kozího mléka byla ve vybraných případech testována kitem RIDA-SCREEN® GIS od společnosti R-Biopharm AG (Pavelka a Orna 2011; Pavelka a Vařeka 2008). Test je založen na imunologické detekci kozího IgG (imunoglobulin třídy G), který je přirozenou součástí kozího mléka. Poté, co firma přestala tento kit vyrábět, jsme pro další analýzy vybrali obdobný produkt s názvem Bio-Shield Goat od firmy ProGnosis Biotech Ltd.

2.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ

První fáze představovala vytvoření samotné vhodné metodiky. Seškrabali jsme z vnitřní stěny a dna několika nádob z archeologických nálezů cca 0,5 g keramické hmoty, nadrtili získaný materiál a smíchali s naředěnými roztoky od příslušných firem (jedná se o extrakční roztoky) v množství cca 200–400 µl. Na rozdíl od pokynů výrobce, které jsou zamýšleny pro recentní vzorky, jsme používali vyšší koncentrace roztoků v poměru přibližně 1:10, nebo 1:15. Posléze jsme roztok s rozpuštěnými organickými částmi a jemným keramickým materiálem aplikovali do detekčních jamek ELISA testu. Následně jsme postupovali podle instrukcí výrobce.

Oproti jiným metodikám (plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie) je u našeho přístupu výhodou absence složitých a zatím nejednotných způsobů extrakce proteinů z keramické matrice. Craig a Collins (2002) srovnávali nejružnější extrakční metody na izolaci proteinu bovinního séra (BSA) z vlastní čisté keramiky, která simulovala svým zpracováním skutečné archeologické nálezy, a následně provedli ELISA testy. Pouze omezený počet extrakčních technik se ukázal jako použitelný (viz Craig a Collins 2002). Avšak zdá se, že pro imunologické ELISA testy nejsou speciální extrakční techniky potřebné a jen by se jimi zvyšovalo riziko poškození proteinů, protože jemně nadrcené zbytky keramiky, sloužící jako jakési nosiče proteinů, nemají na reakci antigen – protilátka nijak zásadní vliv. Protože se jedná o nově použitou metodiku, provedli jsme verifikaci testu na vybraném vzorku na pracovišti hmotnostní spektrometrie na Jihočeské univerzitě se shodným výsledkem (Hlásek et al., v přípravě).

2.4. VZORKY

Pro testování nové metodiky jsme zvolili soubory keramiky z pravěku a pro srovnání i z raného středověku, kdy se používání mléka v přípravě potravin předpokládá již zcela běžně.

Z neolitu jsme využili materiál z Jihočeského muzea v Českých Budějovicích, z lokality Mažice (okr. Tábor) pět keramických zlomků ze sídlištního objektu (mladá fáze kultury s lineární keramikou) a pro srovnání jeden keramický zlomek ze středověku z téže lokality. Další část souboru byla získána ze Západočeského muzea v Plzni. Z Oddělení záchranných archeologických výzkumů se jedná o pět keramických zlomků kultury s lineární keramikou fáze IIc z lokality Radobyčice (okr. Plzeň-město) (Smetana 2010). Zde byl dále získán vzorek z bombovité nádoby z neolitické lokality Křimice a z pohárku nalezeného v dětském hrobu z lokality Křimice – Balčí pošta (okr. Plzeň-město).

Další soubor pocházel ze sbírky Jihočeského muzea v Českých Budějovicích. Jednalo se o keramiku střední doby bronzové z lokality Řepeč (okr. Tábor).

Obrázek 3. Mikrotitrační destička před měřením absorbance.
Picture 3. The microtiter plate prior to measuring absorbance.



Obrázek 4. Přístroj na měření absorbance výsledných reakcí na mikrotitračních destičkách – ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices).

Picture 4. The device for measuring the absorbance of the resulting reaction of the microplates – ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices).



Mladší doba bronzová je zastoupena, keramickým zlomkem z hrobu z lokality Březnice (okr. Tábor) a dále třemi dny nádob, cedníkem a keramickým zlomkem z lokality Rataje III, okr. Tábor a střepem z depotu z katastru obce Podolí ze sbírek Prácheňského muzea v Písku. Starší doba železná (doba halštatská) je reprezentována jednak keramickým zlomkem pocházejícím z hrobu z lokality Březnice (okr. Tábor) z Jihočeského muzea v Českých Budějovicích, jednak keramickým zlomkem ze sbírek Prácheňského muzea v Písku ze sídlištního objektu a keramickým zlomkem z mohyly na pohřebišti z lokality Albrechtice nad Vltavou (okr. Písek). Také jsme pro srovnání a získání většího časového rozptylu vzorků použili vzorek z přelomu raného a vrcholného středověku z lokality Heřmaň (okr. Písek) (Prácheňské muzeum), jednalo se o jeden keramický střep ze sídlištního objektu.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1. NOVÁ METODIKA

Aplikace metodiky s ověřenými protilátkami se v případě testů na beta laktoglobulin u kravského mléka ukázala jako plně použitelná i na zbytky mléčných produktů z drčené porézní keramiky. Ze 12 vzorků z různých období byly 4 pozitivní, poněkud paradoxně všechny z mladší doby bronzové (lokality Březnice, Podolí, Rataje – 2x), nicméně z tohoto období bylo nejvíce odběrů (tabulka 1). Byla také provedena verifikace metodiky na knovízské amfoře (Hlásek et al., v přípravě). Díky těmto datům a vzhledem k verifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie, kdy byla seškrábána keramika stejným způsobem, ale proteiny extrahovány na pracovišti hmotnostní spektrometrie Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích s identickým výsledkem jako pomocí protilátek (Hlásek et al., v přípravě), bylo možno metodiku považovat za průkaznou.

Metodu ovšem nelze použít tam, kde jsou proteiny v keramice poškozeny či zcela zničeny způsobem, který neodpovídá prosté dlouhodobé degradaci v běžných archeologických situacích. Jako příklad můžeme uvést několik vzorků z muzea v Čelákovících, lokalita Květnice, převážně z mladší doby bronzové. Zde se nepodařilo uskutečnit jedinou pozitivní reakci, zřejmě proto, že nádoby byly během laboratorního čištění nálezů ošetřeny kyselinou chlorovodíkovou a tekutým mýdlem (Hlásek et al., v přípravě). Pozitivní imunologické reakce nemůžeme příliš očekávat ani v případě nálezů vyzvednutých z chemicky agresivního prostředí, například ze středověkých městských jámek.

Neolitické vzorky vykazovaly různou míru identifikace zbytků mléka na sledovaných lokalitách (tabulka 2). Jihočeská lokalita Mažice (mladá 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

Tabulka 1: Testování metodiky na keramice z období, kdy se předpokládá běžné používání mléka a mléčných výrobků (++) pozitivní reakce, - negativní výsledek).

Table 1: Testing methodologies for ceramics from the period when it is assumed the routine using of milk and milk products (++) positive reaction - negative result).

Č. vzorku	Lokalita	Stáří vzorku	βLG skotu
1	Řepeč	stř. d. bronzová	
2	Rataje III	ml. d. bronzová	++
3	Rataje III	ml. d. bronzová	-
4	Rataje III	ml. d. bronzová	++
5	Rataje III	ml. d. bronzová	-
6	Rataje III	ml. d. bronzová	-
7	Rataje III	ml. d. bronzová	++
8	Podolí	ml. d. bronzová	++
9	Březnice	st. d. železná	-
10	Albrechtice nad Vltavou	st. d. železná	-
11	Albrechtice nad Vltavou	st. d. železná	-
12	Heřmaň	raný/vrcholný středověk	-

slabě pozitivní a tři byly pro mléko skotu negativní (tabulka 2). Negativní vzorek byl do určité míry kontrolní, protože se jednalo o příškvarek jako v dříve publikovaných pracích (Pavelka a Vařeka 2008; Pavelka a Orna 2011), ostatní vzorky byly získány striktně z keramické hmoty. Vzorky z obou lokalit v Křimicích byly oba na β-laktoglobulin skotu pozitivní, i když reakce byla slabší.

Řada vzorků byla také testována na přítomnost kozího IgG, tedy přítomnosti kozího mléka. Současně s tím byla i prověřována funkčnost nového kitu (detekční sady). Předchozí testy (Pavelka a Orna, 2011; Pavelka a Vařeka, 2008) byly prováděny s již ověřeným kitem RIDASCREEN® GIS od společnosti R-Biopharm AG, která však už tento kit přestala vyrábět. Obdobný kit od firmy ProGnosis Biotech Ltd se ukázal na archeologické zbytky nevhodný, zřejmě protilátka není schopna rozeznat konformačně změněný protein. Kit byl zpětně ověřován na některých vzorcích pozitivně testovaných v minulosti (Pavelka a Vařeka 2008) a bez úspěchu. Nicméně se pokusíme do budoucna najít kit s protilátkou od některého dalšího výrobce, který bude schopen detekovat kozí IgG podobně, jako tomu bylo s kitem od firmy R-Biopharm AG, který se v této studii ukázal jako velmi efektivní. Podle výsledků osteologických analýz obvykle převládá na lokalitách neolitu i doby bronzové v České republice výrazně skot nad drobnými přežvýkavci (koza, ovce), i když jsou naleziště, která se výrazně odlišují (Kovacicova et al. 2012; Roblíčková 2003). Imunologická metodika má potenciál ověřit, zda se na konkrétní lokalitě shodují osteologická data a poměry mléka na keramice a porovnat tak vypovídající schopnost obou indikátorů využívání různých druhů domácích zvířat.

V případě testů na přítomnost kozího mléka se překvapivě ukázalo, že kozí proteiny jsou na testované keramice přítomny velmi často. Ze 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,

Tabulka 2: Testování neolitických vzorků (++) pozitivní reakce, + slabě pozitivní reakce, - negativní výsledek).

Table 2: Testing Neolithic ceramics (++) positive reaction, + weak positive reaction, - negative result).

Č. vzorku	Lokalita	Stáří vzorku	β LG skotu	kozí IgG	Poznámka
1	Radobyčice 1	LnK II	-	++	příškvarek
2	Radobyčice 2	LnK II	++	++	
3	Radobyčice 3	LnK II	-	++	
4	Radobyčice 4	LnK II	+	-	
5	Radobyčice 5	LnK II	-	++	
6	Křimice – Balící pošta	LnK II	+		dětský hrob, rytá výzdoba
7	Křimice 98	LnK II	+		
8	Horoměřice 1	LnK II–III	-	++	
9	Horoměřice 2	LnK II–III	-	++	
10	Horoměřice 3	LnK II–III	-	++	
11	Horoměřice 4	LnK II–III	?	++	
12	Horoměřice 5	LnK II–III	-	++	
13	Mažice 1	LnK III	-	+	
14	Mažice 3	LnK III	-	+	
15	Mažice 4	LnK III	-	+	
16	Mažice 5	LnK III	-	+	
17	Mažice 6	LnK III	-		
18	Mažice 2	středověk	+		

což vylučuje případnou falešnou pozitivitu testu, který vyšel překvapivě v takovém rozsahu pozitivně. Z finančních důvodů byly testovány pouze vzorky z neolitu. Jako kontrola byl zvolen standard s velmi malým obsahem kozího mléka (0,05 %). Všechny zaznamenané výsledky tuto hodnotu vysoce překračovaly. Pro přesnější odhad množství kozího mléka v keramice by však byla zapotřebí další série testů. Pro potřeby archeologie je však důležitým zjištěním, že se vůbec podařilo prokázat přítomnost kozích IgG na téměř každém testovaném keramickém zlomku, byť prozatím jen kvalitativním způsobem.

3.2. INTERPRETACE ZÍSKANÝCH DAT A V KONTEXTU VÝŽIVY V NEOLITU

Na základě získaných výsledků (viz Tabulka 2) je možno otevřít diskuzi o původu mléka detekovaného v pravěkých keramických nádobách, protože předchozí studie (Craig et al. 2004; Craig et al. 2005a; Craig et al. 2005b; Craig et al. 2011) nebyly druh mléka schopny rozlišit.

Z dosavadních, početně zatím málo reprezentativních výsledků se zdá, že se užívání kravského mléka, respektive mléčných výrobků z něj vyrobených, mohlo lišit v jednotlivých regionech. Je však třeba zdůraznit, že oproti jiným studiím (např. Copley et al. 2003; Craig et al. 2005a; Craig et al. 2005b; Craig et al. 2004) máme zatím zpracováno jen velmi málo vzorků z jednotlivých lokalit. Na druhou stranu, tolik získaných pozitivních výsledků na kozí mléko asi nebude pouze

náhodná fluktuace. Tak vysoké zastoupení kozího mléka v analyzovaném souboru patrně naznačuje jeho velmi rozšířenou konzumaci, přičemž absence metody, jak vzájemné poměry zastoupení mléka různých zvířecích druhů v jídelníčku zkoumat na základě archeologických pramenů, mohla vést k relativnímu podcenění jeho skutečného významu. Nicméně existuje řada dokladů o tom, že kozí mléko bylo podáváno dětem, starším lidem a jiným skupinám se specifickými požadavky na výživu, neboť je díky svému složení pro lidský organismus lépe stravitelné a nutričně využitelné než mléko kravské (Ceballos et al. 2009; Devendra a Burns 1983; Haenlein 2004). Je proto otázkou, nakolik mohlo být v lokalitách, kde nebylo mléko skotu identifikováno, nahrazeno kravské mléko mlékem kozím. Primárně se doposud předpokládalo, vzhledem k dominanci kostí skotu v osteologických nálezech, že nejběžněji používané bylo mléko kravské. Zatím nejsme schopni rozhodnout, zda jeho zdánlivá absence na některých pravěkých lokalitách není dána spíše jen shodou okolností. Nelze totiž zcela vyloučit možnost, že kravské mléko a z něj pocházející mléčné výrobky byly používány v relativně vyrovnaném poměru, ale keramické nádoby byly používány především pro kozí mléko. Přestože keramika představuje v archeologických pramenech pro zemědělský pravěk dominantní kategorii nálezů, musíme vzít v úvahu, že byly v živé kultuře jistě používány také dřevěné nádoby a kožené měchy, přičemž každá z těchto skupin mohla mít specializované využití (Beneš 1989; Vencel 1984).

3.3. OTÁZKA ŠÍŘENÍ MUTACE 13910 * T PRO PERZISTENCI LAKTÁZY V DOSPĚLOSTI

Z prací, které analyzovaly mutaci umožňující trávit laktózu v dospělém věku na základě archaické DNA (aDNA), plyne, že lidé v neolitu nebyli schopni laktózu trávit. Ve studii (Burger et al. 2007) byl úspěšně osekvenován 1 vzorek lidské kostní tkáně z prostředí mezolitické ekonomiky východního Polska a 8 neolitických vzorků DNA z východního Německa, Maďarska, severovýchodního Polska a Litvy. Jak se také nedávno překvapivě ukázalo na 23 vzorcích ze třinácti jednotlivců z prostoru Velké dunajské kotliny na východě Maďarska, získaných z objektů datovaných od neolitu do doby železné, tamní populace patrně nebyly schopny trávit laktózu až do konce doby bronzové (Gamba et al. 2014). Ovšem mutantní alela umožňující trávení laktózy se zřejmě vyskytovala v Evropě i před dobou bronzovou, ale její geografická distribuce byla velmi nerovnoměrná. Ve skandinávském prostředí přežívající lovecko-sběračské ekonomiky v době současné s naším eneolitem bylo ze zkoumaných 14 jedinců spolehlivě analyzováno 10, přičemž u jednoho se našla tato mutace v heterozygotním stavu. To znamená, že frekvence byla velmi nízká (5 %) na rozdíl od současnosti, kdy v současné švédské populaci je ve vysoké frekvenci 74 % (Malmström et al. 2010), jiné zdroje uvádějí ještě podstatně vyšší údaje, kolem 90 % (Witas et al. 2015). Rovněž na Britských ostrovech je podíl aktivní laktázy v dospělosti velmi vysoký, přes 90 %. Obecně je dnes patrný rozdíl mezi severní Evropou s průměrem 70–80 % persistence laktázy a jihem kontinentu s podílem pouhých 5–10 %. Tento latitudinální gradient byl prokázán opakovaně, a to nejen porovnáním mezi státy, ale i komparací dílčích regionů v rámci Británie (Smith et al. 2009).

Velmi zajímavé je pozorování, že alelu zodpovídající za perzistenci laktázy se zatím nepodařilo detekovat na archeologickém kosterním materiálu souvisejícím s předpokládanými směry neolitizace Evropy, tj. Podunajím (balkánský neolit a kultura s lineární keramikou) a podél středomořského pobřeží (kultury s kardiouou keramikou). To potvrzuje i nová studie (Witas et al. 2015) hledající alelu pro perzistenci laktázy v archeologickém kosterním materiálu z polských Kujav. Zde byly získány DNA sekvence ze 131 jedinců datovaných od neolitu (9) přes konec doby bronzové až starší dobu železnou (8), dobu římskou (34) až po středověk (80 jedinců). Všechny neolitické vzorky byly vyhodnoceny jako patřící jedincům netolerujícím laktózu v dospělosti a teprve vzorky datované do doby halštatské přinesly z osmi zkoumaných jedinců dva s přítomnou alelou 13910 * T, z nichž jeden jedinec byl homozygotní. Na lokalitách z doby římské a středověku byla perzistence laktázy detekována poměrně často, na různých lokalitách se ovšem lišila v rozsahu 46–86 %. Tyto výsledky zhruba potvrzují situaci zjištěnou v jiných částech střední Evropy, kde se daří hledanou alelu zachytávat až v závěru doby bronzové a na počátku doby železné. Pozoruhodné je ovšem v této souvislosti zjištění, že poměrně vysoká frekvence tolerance laktózy (27 %) byla zjištěna v Baskicku na severu Iberského poloostrova velmi časně – někdy po roce 3000 př. Kr., tedy ještě v tamním závěru neolitu. Šíření alely společně s vlnou příchozích neolitických zemědělců do Evropy z Předního východu se tedy zdá být nepravděpodobné; vzhledem k výše uvedenému by snad mohla být ve hře alternativní cesta z Afriky přes Gibraltar na Iberský poloostrov a dále severozápadní Evropou (Witas et al. 2015). Nelze pochopitelně vyloučit ani jiný scénář (viz níže), neboť žádná z pracovních hypotéz zatím nebyla přesvědčivě podpořena empirickými daty.

I přes většinovou netoleranci laktózy v dospělé populaci se ovšem v mnoha regionech Evropy na neolitických lokalitách nacházejí stopy mléka na keramických nádobách a podle našich prvních výsledků je tomu tak také v západních Čechách. Evidentně tedy mléko sloužilo jako potrava, ale nejspíše nikoli v syrové podobě. Jak tedy bylo v pravěku mléko zpracováváno? Jak jsme již zmínili v úvodu, řešení spočívalo v nalezení empirických postupů, které i bez znalosti moderní vědecké teorie vedly k odstranění nebo alespoň redukci obsahu mléčného cukru (laktózy). Další výzkum by proto bylo zapotřebí zaměřit i tímto směrem. Ideální by bylo vytvořit metodiku k testování přítomnosti laktobacilů, bifidobaktérií a kvasinek v archeologických nálezích keramiky, a tím způsobem detekovat, zda mléko bylo kysáno či kvašeno.

Naskytá se otázka, zda je možno poznatek o běžném rozšíření schopnosti trávit laktózu v dospělém věku v Evropě až v době železné zevšeobecňovat, nebo zda se vyskytovala od počátku neolitu, anebo ještě dříve jako relativně vzácná mutace, která se později rozšířila, protože byla pro své nositele prospěšná a umožňovala jim dosahovat vyšší reprodukční úspěšnosti (Bersaglieri et al. 2004; Gerbault et al. 2011; Sabeti et al. 2007). Vždy se v zatím dostupných studiích jedná o jeden pozitivní vzorek s detekovanou mutací, buď ze třinácti (Gamba et al. 2014), nebo z deseti (Malmström et al. 2010), případně dva z osmi (Witas et al. 2015). Je zřejmé, že je doposud k dispozici velmi málo dat z archaické DNA. Ovšem zmiňovaný soubor z dnešního Maďarska z doby železné ukazuje na možnou souvislost s kočovníky – doloženou blízkostí genomu k východním populacím a i z archeologického hlediska

ukazují zkoumané artefakty pohřebního ritu spíše na stepní charakter (Gamba et al. 2014). Kočovníci z přelomu doby bronzové a železné se v tomto regionu obvykle řadí k historickým Kimmerijcům (Chochorowski 1993).

Nabízí se tedy i další možnost, že evropská mutace pro toleranci k laktóze vznikla mnohem dříve ve stepích a šířila se z východu přirozeným genetickým tokem a silněji při opakovaných indoevropských migracích. Pokud se migrace Indoevropanů dá ztotožnit s haplotypovým markerem chromozómu Y R1a1a (R-M17, R-M198), i když to v současnosti není jisté (Underhill et al. 2010), a jedna z uvažovaných možností vysvětlení je, že původní Indoevropané nedošli dále než do střední Evropy a jazyk, případně další kulturní atributy, se mohly dále šířit sekundárně. To by potvrzovaly i výzkumy, které naznačují, že mutace pro trávení laktózy se dostala na sever Evropy migrací a je spojována s nástupem šňůrové keramiky, tedy zřejmě Indoevropany (Vuorisalo et al. 2012; Cramp, Evershed et al. 2014), ovšem domníváme se, že by tato teze měla být řádně prověřena na úrovni archaické DNA. Ale ať už mutace vznikla kdekoliv, zůstává pak nezodpovězenou otázkou, proč a jak se mutace šířila Evropou, protože nyní je její největší frekvence v severozápadní Evropě (Leonardi et al. 2012). Je třeba vzít v úvahu, že vzhledem k přírodním podmínkám je tato mutace nejvýhodnější právě na severozápadě Evropy, proto se tam mohla postupně nejvíce prosadit. Mléko je totiž bohatým zdrojem vitamínů D (kalciferolů), které jsou důležité pro hospodaření organismu s vápníkem a fosforem. Normálně se tyto vitamíny vytvářejí v kůži pomocí slunečního záření, avšak při jeho nedostatku je vhodné ho tělu dodávat v potravě, například zahrnutím mléka do jídelníčku. Proto schopnost trávit mléko (laktózu) poskytuje výraznou výhodu právě na severu Evropy. To ovšem nevysvětluje zvýšenou frekvenci výskytu mutace v některých oblastech položených blízko rovníku, jako je západní Afrika a jihozápadní Asie. Zdá se, že došlo k několika nezávislým procesům adaptace na trávení laktózy a jedná se tedy o složitější a zatím neobjasněný vztah příčin a následků (Smith et al. 2009).

Největší selekční tlak byl asi v době krizí, jaké představovaly hladomory, války, migrace nebo epidemie. Z tohoto hlediska je zajímavé se podívat na výskyt dané mutace ve středověku, protože máme k dispozici data z aDNA z 18 jedinců (extrakce byla prováděna z 36 jedinců, ale ne vždy úspěšně) ze středověkého hřbitova v Dalheimu v Německu. Tato studie vyvozuje, že do roku 1200 našeho letopočtu stoupla tolerance k laktóze, tedy frekvence naší mutace na více než 70 % oproti starším dobám, a to minimálně ve sledované lokalitě. V dnešním Německu a Rakousku se odhaduje na frekvence mutace na 71 až 80 % (Krüttli et al. 2014).

Naproti tomu vzorky aDNA jen o málo starší, opět z Maďarska, ale ze středověku (10.–11. stol.), kde byly úspěšně analyzovány vzorky z pozůstatků 23 jedinců, prokázaly, že alela pro tvorbu laktázy v dospělosti tam byla přítomna pouze v 11 % frekvenci (Nagy et al. 2011). Někteří autoři spekulují o tom, zda zvýšení četnosti alely pro toleranci k laktóze nemohla způsobit selekce a genetický drift během morových epidemií (Krüttli et al. 2014).

Data jsou zatím příliš nekonzistentní v čase i ve stupni poznání evropských regionů, nicméně efekt postupného zvyšování četnosti alely je nepopiratelný. Z populačně genetického hlediska by nejrazantnější prosazování alely mělo přicházet v době snižování velikosti populací, kdy tato vlastnost poskytovala výraznou

výhodu. Asi by tedy bylo nejvýhodnější další mapování archaické DNA s důrazem na místní populace před a po závažných krizích.

4. HLAVNÍ ZÁVĚRY A VÝHLEDY DO BUDOUCNA

V této studii jsme se zaměřili na detekci stop mléka v pórovité hmotě keramických nádob, získaných archeologickým výzkumem lokalit z jihozápadních Čech, datovaných do neolitu, doby bronzové, doby železné a okrajově i středověku. Ve všech těchto obdobích lze předpokládat konzumaci mléka a existenci keramických nádob, v nichž bylo mléko skladováno a zpracovááno. Prokázali jsme funkčnost nové, velmi jednoduché metodiky, založené na detekci termostabilních antigenů pro zjišťování přítomnosti zbytků mléčných proteinů v porézní keramice pomocí imunologických testů. Podrobněji jsme se zaměřili na vzorky datované do neolitu, kde jsme v pozitivních vzorcích rozlišili pomocí druhově specifických protilátek mléko skotu a mléko kozí. Získané výsledky ukazují překvapivě vysoké zastoupení kozího mléka oproti mléku kravskému. Je zřejmé, že podíl různých druhů domestikovaných zvířat na mléčné produkci může být ovlivněn řadou faktorů a že bude třeba do budoucna věnovat této otázce více pozornosti. V závěru článku shrnujeme současný stav výzkumu zaměřeného na schopnost trávení mléčného cukru laktózy u minulých evropských populací a zvažujeme další možnosti řešení této problematiky.

POUŽITÉ ZDROJE

- BENEŠ, Jaromír (1989): Reprezentativnost mobilní části archeologických kultur ve srovnání s etnografickými prameny. *Archeologické rozhledy*, roč. 41, č. 4, s. 629–649.
- BERSAGLIERI, Todd, SABETI, Pardis C., PATTERSON, Nick et al. (2004): Genetic Signatures of Strong Recent Positive Selection at the Lactase Gene. *The American Journal of Human Genetics* 74, s. 1111–1120.
- BJÖRKLUND, Erland, PALLARIONI, Lea, VON HOLST, Christoph et al. (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, s. 1839–1845.
- BRANDT, Elisabeth, WIECHMANN, Ingrid and GRUPE, Gisela (2002): How reliable are immunological tools for the detection of ancient proteins in fossil bones? *International Journal of Osteoarchaeology* 12, s. 307–316.
- BURGER, Joachim, KIRCHNER, Martina, BRAMANTI, Barbara et al. (2007): Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, s. 3736–3741.
- CABALLOS, S. Laura, MORALES, Eva R., de la TORRE ADARVE, Gloria, CASTRO, Javier D., MARTÍNEZ, Luis P. a SAMPELAYO, María R. S. (2009): Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, roč. 22, č. 4, 322–329.
- COPLEY, Mark S., BERSTAN, Robert, DUDD, Stephanie N. et al. (2005a): Processing of milk products in pottery vessels through British prehistory. *Antiquity* 79, s. 895–908.
- COPLEY, Mark S., BERSTAN, Robert, MUKHERJEE, Anna J. et al. (2005b): Dairying in antiquity. III. Evidence from absorbed lipid residues dating to the British Neolithic. *Journal of Archaeological Science* 32, s. 523–546.

- CRAIG, Oliver E., CHAPMAN, John, FIGLER, András et. al. (2003): 'Milk Jugs' and other Myths of the Copper Age of Central Europe. *European Journal of Archaeology* 6, s. 251–265.
- CRAIG, Oliver E., CHAPMAN, John, HERON, Carl et al. (2005): Did the first farmers of central and eastern Europe produce dairy foods? *Antiquity* 79, s. 882–894.
- CRAIG, Oliver E., LOVE, Gordon D., ISAKSSON, Sven et. al (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, s. 613–634.
- CRAIG, Oliver E., STEELE, Valerie J., FISCHER, Anders et. al (2011): Ancient lipids reveal continuity in culinary practices across the transition to agriculture in Northern Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, s. 17910–17915.
- CRAMP, Lucy E. J., EVERSLED, Richard P., LAVENTO, Mikka et al. (2014): Neolithic dairy farming at the extreme of agriculture in northern Europe. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 281, No. 20140819.
- CRAMP, Lucy E. J., JONES, Jennifer, SHERIDAN, Alison et al. (2014): Immediate replacement of fishing with dairying by the earliest farmers of the northeast Atlantic archipelagos. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 281.
- DEVENDRA, C., BURNS, M. (1983): *Goat production in the tropics*. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- DONGOSKE, Kurt E., MARTIN, Debra L. a FERGUSON, Thomas J. (2000): Critique of the Claim of Cannibalism at Cowboy Wash. *American Antiquity* 65, s. 179–190.
- DUNNE, Julie, EVERSLED, Richard P., SALQUE, Mélanie, CRAMP, Lucy, BRUNI, Silvia, RYAN, Kathleen et al. (2012): First dairying in green Saharan Africa in the fifth millennium BC. *Nature* 486/7403, s. 390–394.
- EVERSLED, Richard P., PAYNE, Sebastian, SHERRATT, Andrew G., COPLEY, Mark S., COOLIDGE, Jennifer, UREM-KOTSU, Dushka et al. (2008): Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature* 455/7212, s. 528–531.
- GAMBA, Cristina, JONES, Eppie R., TEASDALE, Matthew D. et al. (2014): Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature Communications* 5, s. 1–9.
- GERBAULT, Pascale, LIEBERT, Anke, ITAN, Yuval et al. (2011): Evolution of lactase persistence: an example of human niche construction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 366, s. 863–877.
- HAENLEIN, F. W. George (2004): Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, roč. 51, č. 2, s. 155–163.
- HALSTEAD, Paul a ISAAKIDOU, Valasia (2011): Revolutionary Secondary Products: the Development and Sacrifice of Milking, Animal-Traction and Wool-Gathering in Later Prehistoric Europe and the Near East. In: Wilkinson, T. C, Sherratt, S. a Bennett, J. (eds.), *Interweaving Worlds: Systemic Interactions in Eurasia, 7th to the 1st Millennia BC*. Oxford: Oxbow Books, s. 61–76.
- HLÁSEK, Daniel, ČIPEROVÁ, Monika, PAVELKA, Jaroslav (v přípravě): *Amphorae as a part of dairy equipment. Evidence from prehistoric Bohemia*.
- CHILD, Angela M. a POLLARD, Mark A. (1992): A review of the applications of immunochemistry to archaeological bone. *Journal of Archaeological Science* 19, s. 39–47.
- CHOCHOROWSKI, Jan (1993): *Ekspansja kimmeryjska na tereny Europy środkowej. Rozprawy habilitacyjne Nr 260*. Kraków: Uniwersitet Jagielloński.

- ITAN, Yuval, POWELL, Adam, BEAUMONT, Mark A. et al. (2009): The Origins of Lactase Persistence in Europe. *PLoS Comput Biol* 5(8), e1000491 doi:10.1371/journal.pcbi.1000491.
- JOHN, Jan a PAVELKA, Jaroslav (2010): Imunologická analýza rezidua na vnitřní straně eneolitické nádoby z lokality Otmíče – Otmíčská hora (okr. Beroun). In: Křišťuf, Petr a Vařeka, Pavel (eds.): *Opomíjená archeologie 2007–2008 (Neglected Archaeology 2007–2008)*. Plzeň: Katedra archeologie Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni, s. 156–157.
- KOVACIKOVA, Lenka, BRÉHARD, Stephanie, SUMBEROVA, Radka et al. (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, s. 71–97.
- KRÜTTLI, Annina, BOUWMAN Abigail, AKGÜL, Gülfirde et al. (2014): Ancient DNA Analysis Reveals High Frequency of European Lactase Persistence Allele (T-13910) in Medieval Central Europe. *PLoS ONE* 9(1), e86251. doi:10.1371/journal.pone.0086251.
- LEONARDI, Michela, GERBAULT, Pascale, THOMAS, Mark G. a BURGER, Joachim (2012): The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. *International Dairy Journal* 22, s. 88–97.
- MALMSTRÖM, Helena, LINDERHOLM, Anna, LIDEN, Kerstin et al. (2010): High frequency of lactose intolerance in a prehistoric hunter-gatherer population in northern Europe. *BMC Evolutionary Biology* 10, s. 89.
- NAGY, Dóra, TÖMÖRY, Gyöngyvér, CSÁNYI, Bernadett et al. (2011): Comparison of lactase persistence polymorphism in ancient and present-day Hungarian populations. *American Journal of Physical Anthropology* 145, s. 262–269.
- OUDEMANS, Tania F. M. a 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, s. 197–227.
- PAVELKA, Jaroslav a VAŘEKA, Pavel (2008): Příspěvek k poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku: první výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice z archeologických výzkumů. *Kuděj*, roč. 10, s. 98–109.
- PAVELKA, Jaroslav a ORNA, Jiří (2011): Výsledky analýzy potravinových zbytků na pozdně středověké keramice v Plzni. *Acta Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni*, roč. 3, č. 4, s. 85–98.
- RASTEIRO, Rita a CHIKHI, Lounès (2013): Female and Male Perspectives on the Neolithic Transition in Europe: Clues from Ancient and Modern Genetic Data. *PLoS ONE* 8(4), e60944. doi:10.1371/journal.pone.0060944.
- RICHARDS, Martin, MACAULAY, Vincent, HICKEY, Eileen, VEGA, Emilce, SYKES, Bryan et al. (2000): Tracing European Founder Lineages in the Near Eastern mtDNA Pool. *The American Journal of Human Genetics*, roč. 67, č. 5, s. 1251–1276.
- ROBLÍČKOVÁ, Martina (2003): Domesticated animal husbandry in the Bronze Age on the basis of osteological remains. *Archeologické rozhledy*, roč. 55, č. 4 s. 458–499.
- SABETI, Pardis C., VARILLY, Patrick, FRY, Ben et al. (2007): Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature* 449, s. 913–918.
- SALQUE, Mélanie (2012): Was Milk Processed in these Ceramic Pots? Organic residue analyses of European prehistoric cooking vessels. In: Feulner, F., Doorn, N. L. a Leonardi, M. (eds.): *May Contain Traces of Milk: Investigating the Role of Dairy Farming and Milk Consumption in the European Neolithic*. York: University of York, s. 127–141.
- SALQUE, Mélanie, BOGUCKI, Peter, I. PYZEL, Joanna et al. (2013): Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe. *Nature* 493, s. 522–525.

- SMETANA, Jiří (2010): *Neolitické osídlení povodí řeky Úhlavy*. Nepublikovaná diplomová práce. Plzeň: Katedra archeologie Fakulty filozofické Západočeské univerzity v Plzni.
- SMITH, Georg D., LAWLOR, Debbie A., TIMPSON, Nicket J. al. (2008): Lactase persistence-related genetic variant: population substructure and health outcomes. *European Journal of Human Genetics*, roč. 17, č. 3, s. 357–367.
- SWALLOW, M. Dallas (2003): Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Review of Genetics* 37, s. 197–219.
- UNDERHILL, Peter A., MYRES, Natalie M., ROOTSI, Siiri et al. (2010): Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a. *European Journal of Human Genetics*, roč. 18, č. 9. s. 479–484.
- VAN OVEN, Mannis a KAYSER, Manfred (2009): Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human Mutation* 30, E386-E394. doi: 10.1002/humu.20921.
- VENCL, S. (1994): Nádoby z organických hmot v archeologických nálezech. *Archeologické rozhledy*, roč. 46, č. 4, s. 527–532.
- VUORISALO, Timo, ARJAMMA, Olli, VASEMAGI, Anti et al. (2012): High lactose tolerance in North Europeans: a result of migration, not in situ milk consumption. *Perspectives in biology and medicine* 55, s. 163–174.
- WELLS, Spencer R., YULDASHEVA, Nadira, RUZIBAKIEV, Ruslan et al. (2001): The Eurasian Heartland: A continental perspective on Y-chromosome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, s. 10244–10249.
- WITAS, Henryk W., PŁOSZAJ, Tomasz, JĘDRYCHOWSKA-DAŃSKA, Krystyna et al. (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(4). e0122384. doi:10.1371/journal.pone.0122384.

SUMMARY

Pottery research in archeology is an important pillar for gaining knowledge on the past. Until only recently, however, research has focused largely only on the shape, material or method of firing pottery. Only in recent years have opportunities arisen for studying the remains of food, drink or other materials that have been preserved in pottery (Copley et al. 2005a; Craig et al. 2004; Cramp and Jones et al. 2014). This paper will focus on milk and will attempt to contribute to the debate by being the first source to list information on how measurable milk is in pottery containers from the Neolithic period on the territory of today's Czech Republic. In order to form a hypothesis, we first created a methodology that made these designations possible. Previous work studying pottery in the Czech Republic has focused on traces of food that are clearly recognizable, i. e. carbonized "char marks" (Pavelka and Orna 2011; Pavelka and Vařeka 2008), however even these are found in relatively small number. It was necessary to create a method that could analyze remains in porous pottery (similarly Copley et al. 2005a; Copley et al. 2005b). The potential contribution of this study is in bringing forth the first findings on whether cow's milk was actually processed in the Neolithic period on the territory of today's Czech Republic, although this can be assumed judging by the majority of cattle bone findings from the time (Kovacikova et al. 2012).

The method we have applied is partially based on special commercial ELISA sets. These tests are based on the reaction of substrate and antibodies and provide precisely calibrated and guaranteed reactions that are designed to test allergens. This means that they are able to record even the smallest contamination by unwanted proteins in foods. They also have the necessary sensitivity to detect preserved archeological traces. In order to test this new method, we have chosen pottery assemblages from the prehistoric and early medieval periods, when the use of milk in food preparation is assumed to have been

wholly common. From the Neolithic period, we have used the potsherds and remains of containers from several locations in West and South Bohemia.

As concerns the tests for beta-lactoglobulin in cow's milk, the application of these methods with verified antibodies proved to be fully functional even for traces of dairy products extracted from crushed porous pottery. We also found differences in the use of dairy products in the Neolithic period among various locations. Our study is the first to prove that it was cow's milk that was used in Neolithic pottery. The study also differentiates cow's milk from sheep's milk, which is surprisingly also quite abundantly found and confirms the theory that both types of milk were quite largely used. Milk from cattle, however, is found significantly less. A number of hypotheses have been introduced in attempts to explain this fact, e.g. the use of pottery for feeding children with goat's milk as it is more easily digested, while cow's milk may have been produced in such a way that it did not come into contact with pottery as often, which may have been a result of differences in specific local traditions.

In conclusion, we summarize the contemporary state of research on ancient DNA in terms of the ability to digest lactose in the past. Although we point out the fact that data are still too inconsistent in the time and degree of knowledge of European regions, the effect of gradually increasing allele frequency is undeniable. From a population and genetic standpoint, the most significant boost in allele should take place in a period when populations are decreasing, as this characteristic provided a significant advantage. Thus, it is perhaps most appropriate to carry out further mapping with an emphasis on local populations before and after serious crises.