

## **Samenvatting**

---

Moleculaire Studies van Organische Residuen  
Gepreserveerd in Prehistorisch Aardewerk

## *Samenvatting*

De archeoloog heeft tot taak het gedrag van mensen uit het verleden te verklaren. De archeoloog probeert te ontdekken hoe de mensen leefden, wat voor soort familiebanden ze onderhielden, hoe zij hun voedsel verzamelden en voorbereidden, hun maatschappij organiseerden, hun hogere machten vereerden en goederen met naburige groepen ruilden. In tegenstelling tot andere disciplines in de menswetenschappen werkt archeologie slechts met de materiële overblijfselen van de maatschappij als bronmateriaal: de voorwerpen en de structurele overblijfselen van leefruimten (o.a. huizen, haarden, afvalhopen en waterputten), fragmenten van landbouwsystemen, en de resten van speciale activiteitengebieden (o.a. slachtplaatsen, steenwerkplaatsen, pottenbakkershutten of ovens).

Aardewerk assemblages bijvoorbeeld, worden vaak bestudeerd door archeologen op zoek naar informatie over een verscheidenheid aan verschillende aspecten van samenlevingen uit het verleden zoals socio-economische ontwikkelingen, de organisatie van productie en handel, en de mechanismen van culturele interactie. Om conclusies te kunnen trekken over menselijk gedrag op basis van de gefragmenteerde overblijfselen van een ooit bloeiende gemeenschap, is een duidelijk inzicht in de functie van de originele voorwerpen essentieel. Aardewerke potten zijn werktuigen die zijn gemaakt, gebruikt en uiteindelijk afgedankt door mensen in het verleden. Ze waren een deel van het dagelijkse leven van deze mensen. Zonder kennis over de functie van dit aardewerk, zijn we blind voor de informatie die ze bevatten. De archeoloog gebruikt aardewerk zoals de historicus geschreven teksten gebruikt: de informatie die uit de tekst wordt verkregen is moeilijk te interpreteren als het onduidelijk blijft of men een persoonlijk dagboek, een belastingsdocument, een populaire krant of het script van een komedie bestudeert. Door toenemende bewustwording van dit probleem, omvatten aardewerk studies in de archeologie tegenwoordig vaak ook functionele aspecten. Hoewel deze studies regelmatig context-informatie, morfologie en aardewerktechnologie bespreken, blijven de resultaten vaak beperkt tot relatief algemene en non-specifieke classificaties als gevolg van het complexe verband tussen vorm, functie en aardewerk-technologie. Er is onafhankelijke informatie nodig over de utilitaire rol van aardewerk in haar originele gebruiks-context, om te kunnen bepalen welke factoren belangrijk waren in de belevingswereld van mensen in het verleden. Dergelijk informatie kan worden verkregen door de studie van gebruiks-sporen. Gebruiks-sporen zijn gedefinieerd als alle mechanische of chemische veranderingen van het oppervlak of de matrix van het aardewerk als gevolg van oorspronkelijk gebruik (slijtage van het oppervlak; verkleuring van het aardewerk; roet afzetting en organische residuen zoals aanvoetsels aan de binnenkant of buitenkant van de pot of organische stoffen geabsorbeerd in het aardewerk zelf). Eén van de meest recente ontwikkelde onderzoeksrichtingen in het functionele aardewerkonderzoek is organische residuen analyse - de studie van de chemische kenmerken van organische residuen die worden gevonden in directe associatie met aardewerk.

Dit proefschrift doet verslag van een systematische studie van de moleculaire karakteristieken van de organische residuen die bewaard zijn gebleven op aardewerk afkomstig uit een aantal prehistorische vindplaatsen, met als doel het originele gebruik van het aardewerk beter te kunnen bepalen. Het werk is vooral gericht op een collectie vaste residuen die als aanvoetsels op het aardewerk van de inheems-romeinse nederzetting Uitgeest-Groot Dorregeest werden aangetroffen.

Deze studie gaat in op een aantal basisvragen betreffende de toepasbaarheid van moleculaire organische residuen analyse als hulpmiddel in de studie van oorspronkelijk aardewerk gebruik. Natuurlijk leidt de studie van kleine hoeveelheden complexe organische materialen die voor duizenden jaren in de grond zijn bewaard, tot veel methodologische en analytische uitdagingen. De belangrijkste methodologische vragen betreffen de selectie van representatieve en goed-bewaarde residuen, en de ontwikkeling van een analytisch protocol dat aangeeft welke analytische technieken de meest bruikbare informatie verstrekken of het meest complete chemische inzicht verschaffen (zie ook Hoofdstuk 1).

Van een archeologisch standpunt betreffen de meest prominente vragen de interpretatie van chemisch resultaten in termen van originele inhoud en origineel gebruik van het aardewerk. In welke mate kan de originele inhoud worden bepaald en hoe kan de kwestie van origineel gebruik worden benaderd? De meer specifieke vraag over het aardewerk van Uitgeest-Groot Dorregeest was, of groepen potten met verschillende vorm en/of grootte op verschillende manieren werden gebruikt in de Romeinse tijd. De organische residuen die in vier morfologische pottypen zijn gevonden werden bestudeerd om de moleculaire kenmerken van hun originele gebruik te bepalen.

Een breed spectrum van complementaire analytische technieken werd gebruikt om de moleculaire kenmerken van de vaste organische residuen te onderzoeken. De volgende technieken zijn toegepast (Hoofdstuk 1): licht microscopie en scanning electron microscopie (SEM), elementaire CHN analyse, Curie-punt pyrolyse massaspectrometrie (CuPyMS), Curie-punt pyrolyse gaschromatografie/massaspectrometrie (CuPyGC/MS), temperatuur-opgeloste massaspectrometrie (DTMS), gaschromatografie/massaspectrometrie (GCMS) van extraheerbare lipiden, vaste stof  $^{13}\text{C}$  magnetische resonantiespectroscopie ( $^{13}\text{C}$  NMR CP/MAS) en Fourier transform infrarood spectroscopie (FTIR) met behulp van een diamantcel.

De thermische fragmentatiemethodes in combinatie met massaspectrometrie worden geïntroduceerd in Hoofdstuk 2. Curie-punt pyrolyse massaspectrometrie (CuPyMS) werd toegepast om chemische 'vingerafdrukken' van de complete residuen te verkrijgen met inbegrip van de extraheerbare en niet-extraheerbare fracties. Resultaten laten duidelijk zien dat CuPyMS in combinatie met multivariate analyse een goede methode biedt voor snelle, systematische analyse en categorisatie van vaste organische oppervlakte-residuen (33) en bijbehorende grondmonsters (2). De gekozen analytische strategie geeft niet alleen een maat voor de vergelijkbaarheid van de chemische samenstelling van de residuen (en maakt als dusdanig een objectieve classificatie van de residuen mogelijk), maar accentueert ook de chemische componenten typisch voor de diverse clusters residuen. De chemische classificatie was een aantoonbare afspiegeling van het originele aardewerkgebruik, en niet een artefact van post-depositionele chemische veranderingen. Er zijn geen aanwijzingen gevonden voor enige significante uitwisseling van componenten tussen archeologische residuen en de omringende grond (een conclusie die ook door CuPyGC/MS resultaten wordt bevestigd in Hoofdstuk 3). Bovendien bestaat er geen correlatie tussen de chemische samenstelling van de residuen en het type sediment waarin zij zijn bewaard. De CuPyMS resultaten tonen duidelijk dat een correlatie bestaat tussen de chemische samenstelling van de bestudeerde oppervlakteresiduen en het morfologische pottype waarin zij werden gevonden. De kleinere potten van Type I toonden vaak

## *Samenvatting*

roetaanslagen op de buitenkant en residuen van cluster B/D op de binnenkant, terwijl de meerderheid van de residuen in potten van Type II verkoolde zetmeel-rijke materialen van cluster A bevatten. Aardewerke potten van verschillende vorm en/of grootte werden gebruikt voor verschillend dagelijkse taken binnen de inheems Romeinse nederzetting in Uitgeest-Groot Dorregeest. Deze resultaten bevestigen het nut van een morfologische aardewerk-classificatie als basis voor functionele studies binnen dit aardewerkcomplex.

Hoofdstuk 3 concentreert zich op de meer gedetailleerde identificatie van componenten gepreserveerd in de oppervlakte-residuen. Curie-punt pyrolyse gaschromatografie/massaspectrometrie (CuPyGC/MS) heeft de capaciteit een breed spectrum van componenten op niet-selectieve wijze te identificeren. Ook grondmonsters en experimenteel verkoolde moderne levensmiddelen werden geanalyseerd voor vergelijking op moleculair niveau. Het gebruik van CuPyMS, CuPyGC en CuPyGC/MS van verkoolde en niet-verkoolde residuen heeft geresulteerd in de detectie van vele bioorganische componenten, zoals kenmerkende indicatoren voor eiwitten en suikers en andere verbindingen zoals vetzuren, polynucleare aromatische koolwaterstoffen en alifatische polymeren. Duidelijke verschillen in chemische samenstelling tussen de residuen werden aangetoond. De chemische variatie is gerelateerd aan de visuele kenmerken van de residuen.

Zwarte residuen die op buitenzijde van aardewerken potten voorkomen, tonen vele polynucleare aromatische koolwaterstoffen zoals naphthalen en phenanthreen en hun gemethyleerde isomeren. Aangezien deze PAKs van de samples desorberen en vaak in rookcondensaten van houtvuren worden aangetroffen, worden de residuen geïnterpreteerd als resultaat van koken op een open vuur.

De residuen aan de binnenkant van potten tonen drie groepen verbindingen van bioorganische betekenis: indicatoren voor eiwitten, suikers en vetten. Enkele specifieke fragmenten indicatief van verkoolde proteïnen kunnen in de CuPyGC/MS resultaten worden aangetoond. Hoewel de verhitting ernstige denaturatie van de originele peptide-ketens heeft veroorzaakt, zijn sommige korte peptide-ketens en individuele aminozuren bewaard gebleven. Het is mogelijk dat een radicaal-reactie specifieke aminozuur-zijketens chemisch verbind met (of inbed in) het verkoolde materiaal tijdens de vorming van het residue. De eiwit-indicatoren komen vooral voor in combinatie met vrije vetzuren en polysaccharide-indicatoren. In enkele gevallen, komen zij ook voor in combinatie met anorganische componenten (d.w.z. carbonaten) in niet-verkoolde residuen. Enkele specifieke fragmenten indicatief voor verkoolde polysacchariden zijn ook detecteerbaar tijdens CuPyGC/MS. Blijkbaar blijven bepaalde polysaccharide-kenmerken bewaard in verkoolde residuen gevormd bij lage temperatuur (mogelijk als gedehydrateerde oligosacchariden en melanoidinen). Het verhogen van de temperatuur tijdens het verkolen vermindert de herkenbaarheid van de resterende residuen. Lipiden kenmerken werden ontdekt in de vorm van vrije vetzuren, fatty-amiden en alkanen en alkenen. De vrije vetzuren kwamen vrij door simpele verdamping. De vette amiden kunnen worden geproduceerd door vetzuren in combinatie met aminen te verhitten (tot temperaturen van 200 °C of meer). Opvallend is dat de vrije vetzuren en de vette amiden vaak voorkomen in combinatie met eiwit-indicatoren en soms met indicatoren voor polysacchariden. Mono-, di-, of triacylglycerolen werden niet gedetecteerd met de gebruikte pyrolysetechnieken, maar werden aangetoond in de residueun met DTMS (Hoofdstuk 4) en als extraheerbare lipiden (Hoofdstuk 5).

In Hoofdstuk 4 wordt temperatuur-opgeloste massaspectrometrie (DTMS) met multivariate technieken gecombineerd om de residuen te groeperen in vijf “chemotypes” en hun kenmerken te vergelijken met de chemische eigenschappen van experimenteel verkoolde moderne levensmiddelen ter bepaling van de biomoleculaire oorsprong van residuen. De studie van 34 vaste residuen met DTMS bevestigde veel van de eerder verkregen CuPyMS resultaten (Hoofdstuk 2 en 3), en heeft geresulteerd in een meer gedetailleerde classificatie (gevolg van het meten van een breder massa-bereik). De temperatuur-opgeloste informatie vergemakkelijkt de interpretatie van de resultaten in termen van chemische structuur. De experimenteel verkoolde moderne levensmiddelen (zetmeel en eiwit) werden gebruikt als referentiemateriaal om de biomoleculaire kenmerken te identificeren die tijdens de thermische degradatie van het koken en verkolen bewaard blijven. Een combinatie van indicatieve componenten en temperatuur-opgeloste informatie van het DTMS profiel, geven aanwijzingen voor de oorsprong van elk chemotype. Chemotype A<sub>1</sub> bevat verkoolde dierlijke producten (waarschijnlijk melk), mogelijk in combinatie met een zetmeel. Chemotype A<sub>2</sub> bevat mild verkoolde (blad) groente gemengd met graan. Chemotype B bevat enkel rookcondensaten (roet) van de houtvuren. Chemotype C bevat een groep vrij diverse residuen representatief voor zowel residuen van mild verkoolde dierlijke producten zonder zetmeel; als residuen van speciale eiwit-rijke, lipide-vrije oneetbare producten (die misschien voor decoratie van aardewerk werden gebruikt). Chemotype D bevat licht verwarmde residuen van eiwit-rijke, lipide-vrije voedingsstoffen of oneetbare producten (beender- of huidlijm). Vele moleculaire kenmerken van het originele voedsel zijn verloren gegaan als resultaat van uitgebreide thermische degradatie tijdens het koken, maar sommige specifieke kenmerken zijn bewaard binnen het nieuwe gevormde verkoolde gecondenseerde polymere materiaal. Hoewel het niveau van interpretatie tot algemene voedselgroepen beperkt blijft, is het de interpretatie van deze specifieke kenmerken die onverwachte en opwindende informatie over de oorsprong van organische residuen uit archeologische context kunnen opleveren.

Hoofdstuk 5 geeft een kwantitatieve studie van de extraheerbare lipiden in verkoolde en niet-verkoolde oppervlakte-residuen en lipiden geabsorbeerd in het ceramisch materiaal van potten zelf inclusief vetzuren, monoacylglycerolen, diacylglycerolen, triacylglycerolen, sterolen en lange-keten alcoholen. Het methodologische argument om oppervlakte residuen te verkiezen als sample-materiaal boven geabsorbeerde residuen (Hoofdstuk 1), werd getest door lipiden van verschillende soorten residuen te vergelijken en door lipiden van verkoolde residuen van verschillende ouderdom te vergelijken.

Resultaten tonen een hogere graad van preservatie van lipiden in oppervlakte-residuen dan in de direct aangrenzende ceramiek van het aardewerk. Niet alleen is in oppervlakte-residuen (vooral verkoolde residuen), de totale lipide-opbrengst per gram sample veel hoger, de hoeveelheid intacte acyl-lipiden en onverzadigde vetzuren is ook hoger in oppervlakteresiduen. Dit verschil in preservatie is waarschijnlijk het resultaat van een hogere temperatuur exposie van lipiden binnen de aardewerke potwand en van de resistente aard van de verkoolde oppervlakteresiduen (vooral wanneer ze ook eiwitten bevatten). Deze ontdekking kan belangrijke gevolgen voor bemonsteringsstrategieën in organische residue-analyse hebben.

## *Samenvatting*

De lipiden extracten van verkoolde en niet-verkoolde oppervlakte-residuen zijn ook zeer verschillend van samenstelling. De verkoolde oppervlakte-residuen tonen de hoogste opbrengsten (in mg/g sample). De niet-verkoolde residuen tonen daarentegen veel kenmerken die een andere aardewerkgebruik suggereren (laag percentage organisch materiaal, een lagere hydrolyse graad, weinig of geen bacteriële degradatie en weinig of geen geabsorbeerd lipidemateriaal in het direct aangrenzende aardewerk). Waarschijnlijkst zijn deze organische residuen blootgesteld aan de lucht zonder ernstige verhitting te hebben ondergaan. De niet-verkoolde residuen zijn mogelijk het resultaat van decoratie van het aardewerk met organische materialen, of het resultaat van opslag of vervoer van vaste organische producten.

De lipiden van verkoolde oppervlakte-residuen van twee Neolithische vindplaatsen (ca. 5000 jaar oud) werden vergeleken met verkoolde residuen van drie inheems Romeinse nederzettingen (ca. 1800-2000 jaar oud). Hoewel de Neolithische verkoolde residuen niet beduidend veel lagere lipide-opbrengsten opleverden, bevatten lipideprofielen meer vrije vetzuren en een meer materiaal van bacteriële oorsprong. Dit fenomeen is waarschijnlijk het resultaat van een voortdurende lage graad van microbiële degradatie in de grond. Enkele aanwijzingen voor vindplaats-specifieke degradatie kunnen ook worden waargenomen.

In Hoofdstuk 6 is Fourier transform infrarood spectroscopie met diamantcel (FTIR) gecombineerd met vaste stof  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopie, ondersteund door elementaire CHN analyse. Een semi-kwantitatieve classificatie van vaste organische residuen uit Uitgeest-Groot Dorregeest kon worden gemaakt. Drie groepen organische residuen (één die uit twee subgroepen bestaat) werden gedefinieerd, gebaseerd op de mate van aromatisatie van het residu volgens de NMR spectra: i) aromatische verkoolde residuen (matig gecondenseerd en hoog gecondenseerd); ii) roomkleurige non-aromatische residuen en iii) roet residuen die polynucleaire aromatische koolwaterstoffen bevatten. Zowel de elementaire C/H/N samenstelling als de FTIR kenmerken waren in directe overeenkomst met de NMR resultaten - en gaven extra informatie over de aard en omvang van de anorganische fractie en de aanwezigheid van een beperkte hoeveelheid specifieke biomoleculaire kenmerken voor lipiden, peptiden en koolhydraten. De matig gecondenseerde verkoolde residuen bevatten kenmerken voor lipiden en peptiden, terwijl de hoog gecondenseerde verkoolde residuen slechts minimale hoeveelheden lipiden en occasionele koolhydratenkenmerken bevatten. De niet-verkoolde residuen tonen FTIR spectra indicatief voor de aanwezigheid van calciumcarbonaat en een kleine hoeveelheid eiwit materiaal zonder lipidecomponent, hetgeen in overeenstemming is met de NMR resultaten die enkel pieken voor alifatische en carboxyl-groepen tonen. FTIR en NMR gegevens bevestigen eerdere resultaten die in analytische pyrolyse studies werden verkregen en ondersteunen de toepassing van DTMS in combinatie met MVA als snelle strategie voor de karakterisering en classificatie van vaste organische oppervlakteresiduen (Hoofdstuk 4).

In Hoofdstuk 7 wordt het werk in dit proefschrift samengevat en bediscussieerd en enkele suggesties voor verdere studie worden gepresenteerd. Organische residuen analyse heeft revolutionaire veranderingen ondergaan sinds 70er jaren. Voortdurende instrumentele innovaties in de analytische chemie hebben het mogelijk gemaakt steeds kleinere organische samples in steeds meer detail te bestuderen. De studie van de moleculaire samenstelling van

extraheerbare componenten, zoals lipiden, harsen en wassen hebben een grote hoeveelheid kennis over hun gebruik in het verleden opgeleverd.

Om moleculaire organische residuen analyse daarentegen te maken tot een krachtig hulpmiddel in de studie van aardwerkgebruik en oude diëten, moeten een aantal basale onderzoeksvragen worden opgelost. Ten eerste, moet vaker de chemische samenstelling van complete organische residuen worden bepaald. In de meeste organische residuen studies schitterend koolhydraten of zetmeel en, in mindere mate eiwitten in afwezigheid.

Ten tweede, moeten er modellen worden geformuleerd voor de vorming van organische residuen in aardewerk en vervolgens experimenteel getest, opdat een beter inzicht kan worden verkregen in de mechanismen van conservering en degradatie van organische residuen. Deze modellen spelen een belangrijke rol in moleculaire organische residuen analyse. Zij vergemakkelijken de vertaling van chemische resultaten op moleculair niveau naar originele potinhoud, en bepalen de selectiviteit van de residue conservering. De modellen geven ons een hulpmiddel om te kunnen bepalen in hoeverre resultaten van organische residuen analyse te extrapoleren zijn naar een bredere archeologische context. Zonder testbare modellen zal organische residueun analyse beperkt blijven tot een soort curiositeit in plaats van haar rechtmatige plaats in te nemen in de essentiële discussie over de betekenis van functie en gebruik in object-gerichte wetenschappen zoals archeologie.

Ten derde, moet er meer aandacht komen voor systematische gebruiksporen studies (met inbegrip van organische residuen-analyse) binnen de ceramische studies in de archeologie. Het is van groot belang om organische residuen analyse in te zetten binnen een archeologische probleemstelling opdat resultaten kunnen worden benut binnen de context van functionele aardewerkstudies. Alleen dan kunnen de resultaten tot hun volle recht komen.

