

## ЛИПАЗНАЯ И ЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ГРУНТАХ ИЗ ДРЕВНИХ ПОГРЕБАЛЬНЫХ СОСУДОВ

© 2023 г. Н.Н. Каширская\*, Е.В. Чернышева\*, С.Н. Удальцов\*, Л.Н. Плеханова\*.\*#

\*Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,  
Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: dianthus1@rambler.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Проведена оценка активности липолитических ферментов микропланшетным методом с использованием гетеромолекулярного обмена в грунтах со дна погребальной посуды, с последующим кластерным анализом. Выявлены группы с контрастным соотношением липаз С12 — С18 и эстераз С4 — С8 в выборке, включающей 57 погребальных горшков возраста двух-трех тысяч лет. Суммарная липолитическая активность образцов грунта из посуды с предположительным исходным присутствием жиросодержащих пищевых заупокойных продуктов составляла выше 6% от максимального значения в пределах выборки. Ингибирование эстераз в присутствии высоких концентраций жирных кислот отражено в предельно низких относительных значениях эстеразной активности почвенного микробного сообщества на фоне максимальных показателей активности липаз С18 и С12 в двух группах горшков. В трех группах наблюдалась эстеразная активность на фоне высокой относительной активности липаз С16, средней относительной активности липаз С18 и предельно низкой активности истинных липаз. В группе горшков с высокой суммарной липолитической активностью (за исключением отдельных экстремальных величин этого показателя) доля активности истинных липаз была в 1.7–1.8 раза выше по сравнению с долей эстеразной активности. Группировка погребальной посуды по соотношению липазной и эстеразной активности отражает характеристики заупокойной пищи, тогда как абсолютные значения активности ферментов среди избранных сосудов с наибольшей суммарной липолитической активностью группируются в соответствии с типом погребения.

*Ключевые слова:* липолитические ферменты, липаза, эстераза, жирные кислоты, погребальные сосуды, посуда, горшки, заупокойная пища, древняя пища, эпоха бронзы, ранний железный век.

DOI: 10.31857/S000630292306011X, EDN: ROSYVA

Разнообразие липидов, обнаруживаемых в археологических материалах, и сопоставимость их с современными вариантами относит эту группу соединений к надежным биомаркерам в определении состава пищевых продуктов древности [1]. Из всех липидных индикаторов культурного слоя, используемых для получения исторической информации о деятельности человека, наиболее широко применяются биомаркеры копролитов в качестве богатого источника информации о диетах [2]. В образцах древней керамики молекулы липидов являются долговечными биомаркерами пищевых продуктов [3]. Хотя интактные триацилглицерины в керамических фрагментах сохраняются далеко не всегда [4], однако в некоторых случаях их количество достаточно для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии, являющейся критерием для установле-

ния происхождения жиров [5]. Липиды в керамике, как правило, сохраняются в порах размером от нано- до микрометра, однако они обнаруживаются и в зонах размером >200 мкм [6], их сохранению способствует образование солей жирных кислот кальция.

В модельных экспериментах старения растительных и животных жиров исследованы процессы термического разложения, окисления и гидролиза липидов, которые могли происходить в археологических условиях [3, 7]. Жирные кислоты, содержащие по меньшей мере одну двойную связь вдоль углеродной цепи, особенно чувствительны к реакциям окисления [3]. Длинноцепочечные  $\omega$ -( $\alpha$ -алкилфенил)алкановые кислоты, получаемые при нагревании ненасыщенных жирных кислот, используются для идентификации водных организмов, употребляемых в пищу в

древности [8]. В результате исследования керамических сосудов нубийского городища Каср-Иб-рим с помощью методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии, были обнаружены насыщенные карбоновые кислоты в диапазоне от C12 до C18, с необычно высоким содержанием C12, что совпало с распределением насыщенных жирных кислот, обнаруженных в ядрах финиковой пальмы [9]. В оливковом масле возрастом две тысячи лет, обнаруженном в стеклянной бутылке на археологических раскопках Везувия, триацилглицерины были полностью гидролизированы, а полученные в результате гидролиза жирные и гидроксигирные кислоты конденсировались в редко встречающиеся эстолиды [10].

Изотопный состав липидных компонентов керамики может дать исчерпывающую информацию о происхождении жиров. Исследования экстрагируемых растворителем липидных компонентов и определение стабильных изотопов углерода основных *n*-алкановых кислот в абсорбированных и карбонизированных остатках жира внутри керамики позволили провести различие между жирами нежвачного (свиного) и жвачного (овечьего или бычьего) происхождения [11]. Анализ изотопного состава липидов из керамических черепков, найденных на побережье Внешних Гебридских островов (Великобритания), выявил смешение жиров жвачных животных и морепродуктов в 71% сосудов [12]. Наличие изопреноидных жирных кислот в липидных остатках, а также характерное значение стабильных изотопов в насыщенных жирных кислотах C16:0 и C18:0 позволило установить назначение керамических кувшинов доколониальных общин хардингов в прибрежных районах Южной Африки [4]. Результаты анализа липидов показали здесь отсутствие молочного жира и наличие жира морских животных. В отличие от наземных животных жиров и растительных масел, масла, полученные из морских животных, содержат значительно большее количество ненасыщенных жирных кислот, особенно с углеродной длиной C18–C22 [4].

Таким образом, остатки липидов в керамических фрагментах способны дать информацию о бытовом использовании древней погребальной посуды. Помещение ритуальной пищи в горшок происходит однократно и не может оказать значительного влияния на состав липидов внутри керамики. В погребении жирная пища смешивается с почвой, стимулируя развитие почвенного липолитического микробного комплекса. Микробные липазы имеют большое значение в археологических исследованиях. В культурных слоях и погребениях липазы, как и другие ферменты [13, 14], выступают в качестве объекта исследования, являясь носителями биологической памяти почв об изменениях условий почвообразования и антропогенной деятельности в прошлом. Способность

ферментов сохраняться в почве связана с условиями, когда разложение органического вещества почвы ограничено [15]. Защиту органического вещества от микробного разложения обеспечивает окклюзия – покрытие поверхности органических фрагментов минеральными частицами фракций пыли и глины [16]. Время существования в почве окклюдированного органического вещества увеличивается на порядок [17]. Кроме того, ферменты, сохраняющие активность в почве на протяжении тысячелетий, должны иметь высокую конформационную стабильность третичной структуры белка, способность сохранять активность при деформации значительных участков биомолекулы [18].

Липолитические ферменты хорошо сохраняются в культурных слоях археологических памятников [19] и сосудах из древних погребений [20]. Они катализируют реакции гидролиза триглицеридов до ди- и моноглицеридов, глицерина и жирных кислот [21], а также обратную реакцию – этерификацию глицерина жирными кислотами в системах с низкой активностью воды [22]. Представители наиболее изученного семейства истинных липаз (по классификации, основанной на сходстве аминокислотных последовательностей [23]) преобразуют длинноцепочечные жирнокислотные субстраты с десятью и более атомами углерода. В целом, к липазам относятся все липолитические ферменты, которые способны высвободить свободные жирные кислоты из длинноцепочечных триацилглицеринов, содержащихся в растительных и животных жирах [24]. Для некоторых липаз отмечается увеличение сродства к субстрату при возрастании длины жирнокислотной последовательности, а также при наличии двойных связей в количестве не более двух [25]. Большее число двойных связей снижает активность, создавая пространственные затруднения при образовании фермент-субстратного комплекса.

Если максимальная активность фермента проявляется в отношении жирных кислот с короткой или средней цепью, их относят к эстеразам [26]. В отличие от истинных липаз, эстеразы могут расщеплять длинные одноцепочечные молекулы жирных кислот, связанных с нитрофенилом, но не способны воздействовать на жиры с тремя углеродными цепями такой же длины. Некоторые микробные липолитические ферменты способны к расщеплению широкого спектра субстратов, хотя в целом уменьшают свою активность при увеличении длины жирнокислотной цепи, однако проявляют более высокую [27] или даже максимальную [28] активность по отношению к жирнокислотным последовательностям средней длины.

Оценка липазной активности и определение численности микроорганизмов, способных вырабатывать липазы, успешно используются в археологической микробиологии [20, 29, 30]. Микробные сообщества почвы вырабатывают липазы в ответ на поступление липидов антропогенного происхождения. Так, при исследовании археологического памятника Сотк-2 (Республика Армения) было выявлено существенное увеличение активности липаз в слое среднего-позднего бронзового века на границе хозяйственной ямы, что в совокупности с другими почвенными характеристиками подтверждает вероятность использования данного участка в качестве места приготовления пищи [19].

Работа микробных липаз является неотъемлемой частью процессов ферментации жиросодержащих пищевых субстратов, а также процессов их порчи и окончательного разложения. В грунте заполнения ритуальных сосудов из древних погребений наблюдается высокая липазная активность, обусловленная исходным наличием питательного субстрата жировой природы [20, 29].

В сосудах с исходным содержанием жирной пищи за образование липаз ответственно как микробное сообщество почвы, попадающей в сосуд, так и микробное сообщество самого пищевого продукта. В условиях погребения микробное сообщество сохраняется в течение неопределенно долгого времени, за счет перехода клеток в покоящееся состояние [31]. При этом значительную долю в погребенных почвах составляют устойчивые группы микроорганизмов, связанные с деятельностью человека [32–34]. Но прежде, чем перейти в состояние покоя, микроорганизмы в сосудах, содержащих пищу, должны воспользоваться избытком органического вещества и выделить ферменты для его утилизации. В древних погребальных сосудах отмечено наличие белкового продукта, на что указывает анализ содержания фосфатов [35].

Однако высокая калорийность пищи и ее значительная масса, сопоставимая с массой почвы, попавшей в сосуд, может оказывать ингибирующее действие на почвенные микроорганизмы и микробные сообщества, а также ингибировать выработку липаз и эстераз. Было установлено, что эстеразы, связанные с клетками *Bacillus*, ингибировались жирными кислотами [36]. Выработка и активность липазы *Pseudomonas fragi* уменьшались при добавлении в среду свиного сала, олеата натрия и солей других ненасыщенных жирных кислот, без влияния на рост клеток [37]. Показана антибактериальная активность сложных эфиров монозамещенных углеводных жирных кислот в отношении ряда бактерий, вызывающих порчу пищевых продуктов, в первую очередь *Listeria monocytogenes*. Известна

антимикробная эффективность свободных жирных кислот — лауриновой (C12:0) и каприловой (C8:0), что в пищевой промышленности используется для борьбы с портящей микрофлорой, особенно с листериями или другими грамположительными патогенами [38]. Лауриновая кислота является наиболее мощной бактерицидной жирной кислотой против грамположительных энтерококков, а каприловая кислота наиболее эффективна против грамотрицательных микроорганизмов, таких, как кишечная палочка [39]. Антимикробные препараты на основе пептидов и жирных кислот длиной от 8 до 12 атомов углерода проявляли оптимальную активность в отношении патогенных штаммов, резистентных к антибиотикам [40]. Моноэфиры сахарозы и жирных кислот проявляли ингибирующий эффект на развитие спор *Bacillus cereus*, предотвращая их переход в размножающиеся клетки, однако по мере снижения концентрации сложных эфиров в среде, клетки возобновляли рост. Потеря антимикробной активности сложных эфиров, наблюдаемая во время культивирования *Bacillus cereus*, была обусловлена их разложением эстеразой [41].

На уровне микробных сообществ, выявлены периоды ингибирования преобладающих микробных групп в анаэробных средах с высоким содержанием липидов. В процессе анаэробного сбраживания содержащих липиды отходов при производстве метана, липиды первоначально гидролизуются до глицерина и длинноцепочечных жирных кислот, которые на следующем этапе преобразуются синтрофными ацетогенными бактериями в водород и ацетат и далее — метаногенными археями, — в метан. Скорость работы микробного сообщества в значительной мере ограничивается накоплением длинноцепочечных жирных кислот, разложение которых происходит по пути β-окисления [42]. Известно, что высокий уровень содержания таких кислот ингибирует деятельность синтрофических ацетогенов и метаногенов, что поначалу объяснялось токсичностью этих соединений и повреждением клеток микроорганизмов [43]. Позднее была выявлена адаптация микробных сообществ к ингибирующим концентрациям длинноцепочечных жирных кислот [44]. В настоящее время не ясно, является ли этот процесс адаптации результатом сдвига микробной популяции в сторону обогащения специфическими и лучше адаптированными разлагателями жирных кислот (популяционная адаптация) или фенотипической адаптации существующих микроорганизмов к их высоким концентрациям (физиологическая акклиматизация). Однако очевидно, что обратимость ингибирования микробного сообщества высокими концентрациями длинноцепочечных жирных кислот связана с постепенным истощением ингибитора ацидогенными микроорганизмами, используя

щими ингибитор в качестве источника питания. Вероятно, механизм ингибирования заключается в адсорбции этих кислот на поверхности клеток, что ограничивает транспортную способность их мембран [45].

Популяционные профили генов 16S рРНК эубактерий и архей показали, что при воздействии длинноцепочечных жирных кислот на микробные сообщества содержащих липиды отходов, преимущественно получали  $\beta$ -окисляющие/протеоолитические бактерии *Syntrophomonas*, *Clostridium*, *Coprothermobacter* и *Anaerobaculum*, а также род синтрофных архей – *Methanosarcina* [46]. Анализ микробного сообщества из анаэробных мембранных биореакторов совместной переработки смазочных материалов и пищевых отходов выявил преобладание *Lactobacillus* (относительная активность 92.2–95.7%) и *Anaerolineaceae* (относительная активность 13.3–57.5%), которые известны как ферментеры и разрушители жирных кислот [47].

Увеличение концентрации аммиака и летучих жирных кислот при высоких нагрузках биореакторов содержащими липиды отходами приводило к смещению метанообразования от более эффективного ацетокластического, с использованием ацетата, к менее эффективному гидрогенотрофному, с использованием водорода. В данном случае, преимуществом получали архей рода *Methanoculleus* [48]. Если же содержимое биореактора было богато не только липидами, но и белками, наблюдалось совместное ингибирование длинноцепочечными жирными кислотами и аммиаком как  $\beta$ -окисляющих, так и метаногенных бактерий, причем на последние в большей мере действовал аммиак [49].

Компостные микробные топливные элементы, используемые для выработки электроэнергии из смеси содержащих липиды пищевых растительных отходов и почвы, могут рассматриваться как модельный вариант аэробных микробных сообществ с высокой липазной активностью. Преобразование содержащих липиды отходов путем компостирования показывает устойчивость к микробному разложению жирных кислот с длинной цепью C19:0, C20:0 [50]. Наличие высоких уровней этих жирных кислот на заключительной стадии компостирования указывает на их малую доступность для аэробной микрофлоры.

В наших объектах исследования – археологических сосудах, заполненных смесью почвы и жиросодержащего субстрата, можно предположить наличие отдельных микроразнообразия с различной проницаемостью для кислорода. Накопление в грунте микробных липаз и эстераз, необходимых для утилизации жиров, должно протекать не равномерно, а с учетом избытка субстрата, который на первых стадиях разложения будет ограничивать

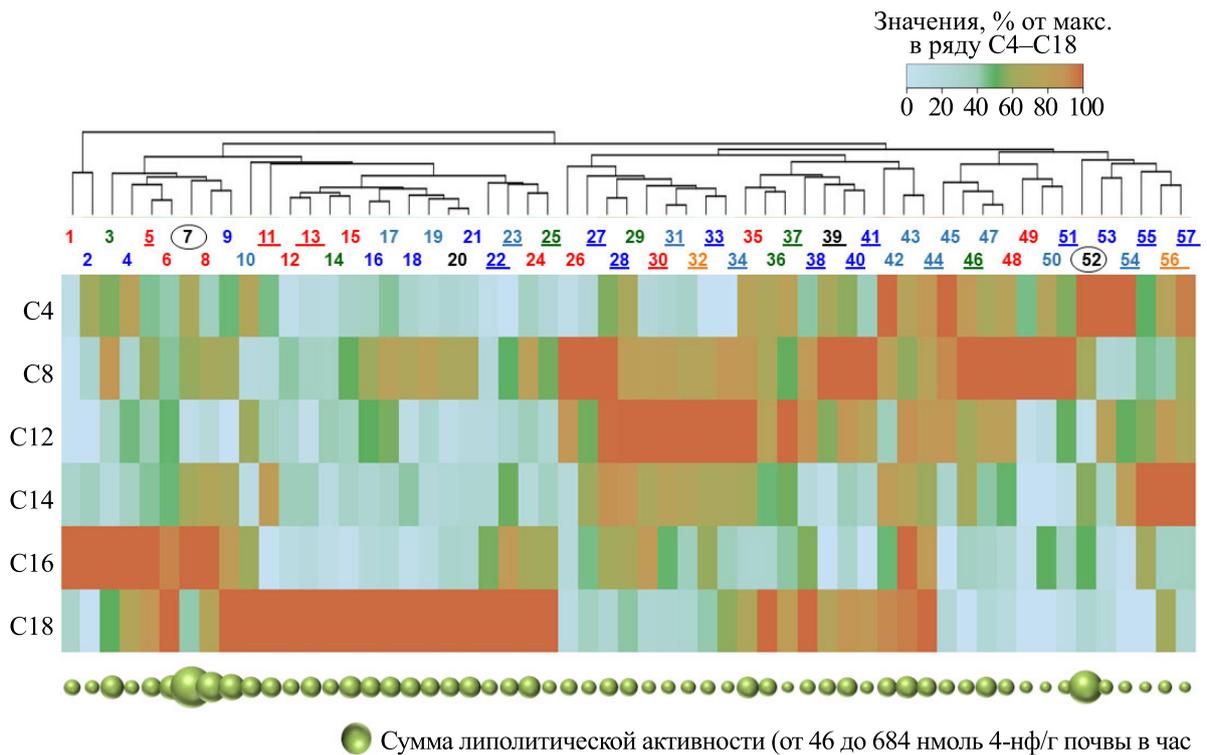
рост микробного сообщества и ингибировать активность микробных липолитических ферментов. Очевидно, что в таких условиях жиры на первых стадиях утилизируются медленно, а по мере их исчерпания происходит активизация микробного сообщества. К моменту перехода микроорганизмов в состояние покоя, в грунте на дне сосуда должно сформироваться определенное соотношение эстеразной активности, присущей почвенному микробному сообществу в естественных условиях, и липазной активности, проявляемой микроорганизмами в целях утилизации жиров. Особенности строения, общие для большинства липаз и эстераз – погруженность активного центра в глубину молекулы, значительные расстояния между элементами каталитической триады – серином, гистидином и аспаратом (или глутаматом) [51], могут в значительной мере обеспечивать их конформационную стабильность в почве.

В наших исследованиях варианты грунта на дне сосудов, обладающие высокой активностью длинноцепочечных липаз в липолитическом комплексе, демонстрируют изменчивость активности эстераз C4 и C8 – от ничтожно малых, близких к нулю значений, до предельно высоких, превышающих активность длинноцепочечных липаз. Мы полагаем, что контрастные случаи соотношения активности липаз и эстераз не являются случайностью и отражают особенности развития липолитического комплекса в грунте заполнения сосудов. При этом баланс липазной и эстеразной активности может выступать в качестве диагностического признака, позволяющего упростить сортировку объектов, когда их многочисленная выборка делится в результате кластеризации на небольшое число крупных группировок с общими свойствами.

Целью настоящей работы является оценка баланса и соотношений липазной и эстеразной активности почвы на дне сосудов из древних захоронений на основе кластерного анализа.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были исследованы образцы грунта со дна 57 ритуальных горшков (используем упрощение для обозначения разных типов ритуальной посуды – мисок кувшинов, кружек и др.) из погребенных курганных могильников «Литвиновский-III» (эпоха бронзы, 2 образца), «Октябрьский-I» (Моздокский район РСО-Алания, ранний железный век, аланская культура, 25 образцов) и «Братские Первые курганы» (Надтеречный район Чеченской Республики, аланская культура, накануне гуннского вторжения, IV в. н.э., 30 образцов). На курганных могильниках «Октябрьский-I» и «Братские Первые курганы» раскопки проведены Институтом археологии РАН совместно с Инсти-



**Рис. 1.** Кластеризованная тепловая карта активности липолитических ферментов в грунте из древней погребальной посуды. Цветовые обозначения типа посуды по номерам внутри выборки: черный – горшки, красный – кружки, оранжевый – корчаги, зеленый – миски, голубой – кувшинчики, синий – кувшины. Обведены номера образцов из погребений курганного могильника «Литвиновский-III» (эпоха бронзы), подчеркнуты номера образцов из погребений могильника «Октябрьский-I» (аланская культура). Остальные образцы относятся к объекту «Братские Первые курганы» (аланская культура).

тутом гуманитарных исследований АН ЧР и ООО НПЦ «ДАРС» в зоне строительства магистрального газопровода «Моздок–Грозный» [52]. Большая часть находок имела характерные признаки посуды аланской культуры: миски с загнутым внутрь бортиком, кувшинчики с ручкой, расположенной на плечиках или в месте максимального расширения тулова, низкие кружки с ручкой, крепящейся к венчику сверху [53].

Образцы грунта отбирали из придонного слоя заполнения горшков толщиной 1–2 см. Пробы отбирали в поле, с соблюдением асептических условий. В лабораторию образцы доставлены в пластиковых пакетах и хранились при комнатной температуре. Липазную активность грунта определяли микропланшетным методом с использованием хромогенно меченных субстратов на основе п-нитрофенола и процедуры гетеромолекулярного обмена [54, 55]. Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку данных проводили с помощью построения кластеризованных тепловых карт [56].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассматриваемые 57 горшков были идентифицированы как «не пустые» среди 66 исследованных горшков. В этих горшках суммарная липазная активность составляла выше 7% от ее максимальной величины. При построении кластеризованной тепловой карты (рис. 1) для каждого «не пустого» горшка наибольшая активность липолитического фермента в ряду С4 – С8 – С12 – С14 – С16 – С18 принималась за 100%, остальные варианты рассчитывались. Кластеризация проведена только в ряду погребальных горшков, тогда как ряд липолитических ферментов не группировался, с целью сохранения последовательности от С4 до С18.

Горшки 1 и 2 выделили в отдельную группу, где была обнаружена только активность липазы С16. Остальные варианты в пределах группы не давали значительного вклада в сумму липолитической активности.

На втором уровне горшки 3–57 образовали две большие подгруппы: горшки 3–25 с высокой активностью липаз С16 и С18 и горшки 26–57, где была выявлена высокая активность вариантов со

средней длиной жирнокислотной последовательности.

Подгруппа второго уровня 3–25 включала ряд погребальных горшков с наиболее высокой суммарной липолитической активностью. На третьем уровне кластеризации подгруппа 3–9 характеризовалась наибольшим вкладом липазы С16 в суммарную активность и заметным вкладом эстераз С4 и С8. Грунт из кружек № 5, 6 и 8 отличался пониженной активностью эстеразы С-4 по сравнению с остальными типами сосудов. Подгруппа третьего уровня 10–25 объединялась на основе максимальной активности липазы С-18. Здесь выделялись кувшинчик 10 и кружка 11 с высокой долей активности эстераз С4; кружки и миска 12–15 с низкой активностью всех вариантов липолитических ферментов, кроме С18; кувшины, кувшинчики и горшок 16-21 с повышенной активностью эстеразы С8 и четыре сосуда различного типа 22–25 с заметным увеличением активности С16.

Подгруппа второго уровня 26-57 включала варианты с меньшей суммарной липолитической активностью. Различия средних значений этого показателя между подгруппами 3-25 и 26-57 составляли 1.7 раза, а коэффициент вариации различался незначительно, составляя 65.6 и 66.3% для первой и второй подгрупп соответственно. В обеих подгруппах степень неоднородности уменьшалась по сравнению с их совокупностью, где коэффициент вариации суммарной активности составлял 72.8%.

На третьем уровне подгруппа 26-44 характеризовалась высокой активностью среднецепочечных вариантов С8-С14, а подгруппа 45-57 демонстрировала увеличение доли эстераз С4 и С8 в суммарной липолитической активности.

Подгруппа четвертого уровня 26-34, включающая посуду большинства представленных типов, отличалась минимальной активностью липазы С18, неоднородными показателями активности липазы С16 и высокой активностью вариантов С8-С14 с максимумом С12 (за исключением горшков 26 и 27 с максимумом С8).

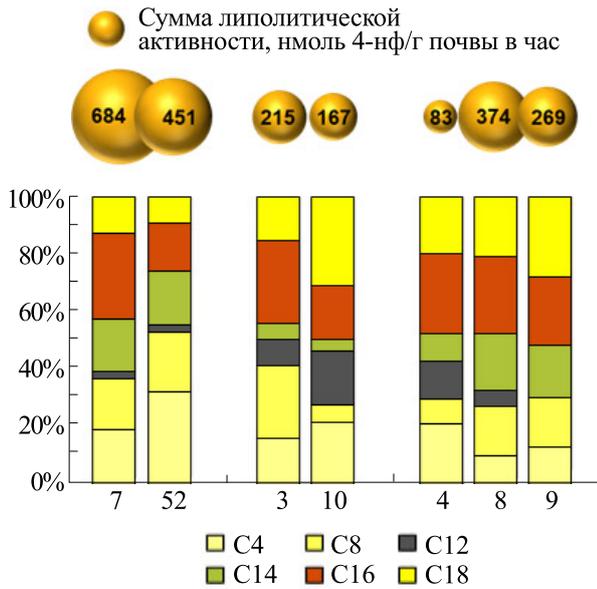
Подгруппа четвертого уровня 5-44 показывала синхронное увеличение доли эстеразы С4 и липазы С18, которое сопровождалось заметным снижением вклада среднецепочечных вариантов С12 и С14.

Таким образом, в общей совокупности из 57 единиц посуды с предполагаемым исходным наличием жиросодержащей пищи было выделено несколько групп с различным соотношением активности липаз и эстераз. Варианты 12-25 с высокой активностью истинных липаз С18, на фоне относительно низких значений активности эстераз и липаз, предпочитающих субстраты со средней длиной жирнокислотной последовательности,

как правило, обладали наиболее высокой суммарной липолитической активностью. В этих вариантах погребальных сосудов, скорее всего, присутствовала пища с высоким содержанием бараньего жира. В процессе развития микробного сообщества в системе «пищевой продукт-почва», преимущество получали продуценты истинных липаз с высокой специфичностью к триглицеридам длинноцепочечных жирных кислот, составляющих наибольшую долю в составе жиров животного происхождения. При этом ингибирование естественной эстеразной активности микробного сообщества могло происходить за счет высоких концентраций этих жирных кислот [36, 57]. Варианты 35-44, где активность липазы С18 в большинстве случаев была сопоставима с активностью С12 и С8 и, в ряде случаев – с активностью С14 и С4, могут указывать на меньшее содержание жира в пищевом продукте.

Варианты 45-57 с низкой активностью истинных липаз и максимальной долей эстераз, как правило, отличались меньшими значениями суммарной липолитической активности по сравнению с вариантами 35-44. Исключение составлял горшок 52 из курганного могильника Литвиновский, с экстремально высокой активностью липолитического комплекса. В этом горшке исходное наличие жирной пищи не вызывает сомнений и подтверждается высокой численностью липолитических микроорганизмов в грунте заполнения. Остальные горшки рассматриваемой группы могли содержать пищу с низким содержанием жира. Таким образом, высокая активность эстераз в этих горшках, вероятнее всего, является показателем высокой биологической активности грунта заполнения.

Наиболее сложным для интерпретации случаем представляется максимальный вклад липаз со средней длиной жирнокислотной последовательности в суммарную липолитическую активность. Варианты 26–34 с низкой активностью истинных липаз и, в большинстве случаев, с низкой активностью эстераз, теоретически могли содержать субстрат, насыщенный остатками лауриновой и миристиновой жирных кислот С12 и С14. Их доля достаточно высока в молочном жире, однако для лауриновой кислоты она составляет всего 2.7%, что почти на порядок меньше по сравнению с пальмитиновой кислотой С16. В тоже время содержание в молочном жире миристиновой кислоты С14 близко к содержанию стеариновой кислоты С18 и составляет около 10%. Таким образом, молочный жир с большей вероятностью присутствовал не в сосудах подгруппы 26–34, а в сосудах подгруппы 3–9, с максимальной активностью липазы С16 и отсутствием видимых признаков ингибирования микробных эстераз. Последний факт косвенно свидетельствует о наличии достаточного количества белка в молочном



**Рис. 2.** Сумма и соотношение активности липолитических ферментов в грунте со дна некоторых горшков из древних погребений (номера соответствуют номерам на рис. 1). Образцы 7, 52 – горшки из погребений 9 и 10 первого кургана в составе могильника эпохи бронзы «Литвиновский-III». Образцы 3 и 10 – из миски и кувшинчика детского погребения 1355; образцы 4, 8 и 9 – кувшин, кружка и кувшин-подношение из семейного погребения 1452 курганного могильника аланской культуры «Братские Первые курганы».

продукте. Необходимо отметить, что из грунта со дна сосудов подгруппы 3–9, за исключением образца 5, были выделены культуры бактерий, способные к сбраживанию молока.

В большинстве сложно интерпретируемых вариантов 26–34 липаза С16 проявляла заметную активность, однако меньшую по сравнению с липазой С12. Кроме того, здесь имело место ингибирование эстеразной активности микробного сообщества, что может объясняться значительной концентрацией длинноцепочечных жирных кислот в составе субстрата. Не исключено, что в сосудах группы 26–34 также мог присутствовать молочный жир, но более концентрированный по сравнению с вариантами 3–9. Максимальная активность липаз С12 в данном случае может быть связана с особенностями микробного сообщества, где преимущество получают определенные группы микроорганизмов, вырабатывающие липазу именно с такими свойствами. Как было показано выше, некоторые микробные липолитические ферменты (а также их группы), способные к расщеплению широкого спектра субстратов, хотя в целом уменьшают свою активность при увеличении длины жирнокислотной цепи, однако проявляют более высокую [27] или даже мак-

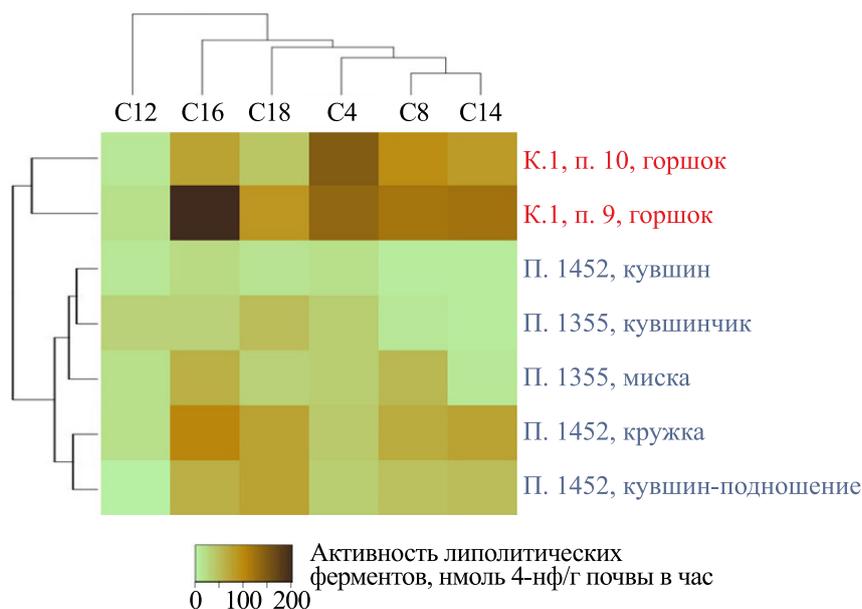
симальную [28] активность по отношению к остатку лауриновой кислоты С12.

Таким образом, в результате кластерного анализа активности липолитических ферментов в грунте со дна горшков из древних погребений были выявлены варианты с различным соотношением эстераз и липаз. Две группы горшков – 12–25 и 26–34 – демонстрировали ингибирование эстеразной активности микробного сообщества на фоне максимальной активности липаз С18 и С12, что может свидетельствовать о наличии продукта с высоким содержанием жира и низким содержанием белка.

В грунтах на дне остальных горшков была выявлена заметная эстеразная активность, что свидетельствует об относительном благополучии микробного сообщества почвы, смешанной с другими пищевыми субстратами. Как мы полагаем, эти субстраты с наибольшей вероятностью могли содержать бараний жир (варианты 35–44), молочный жир (варианты 3–9) или незначительное количество жира (варианты 45–57).

В горшках из близких погребений 9 и 10 первого кургана могильника «Литвиновский III» (рис. 2) была отмечена предельно высокая суммарная липолитическая активность грунта. В образце с максимальной суммарной активностью активность эстераз С4 и С8 составляла 37%, а активность истинных липаз С16 и С18 – 42%. Другой образец показывал значительно большую долю активности эстераз – 53%, причем активность истинных липаз в сумме составляла всего 26%. Миска и кувшинчик из детского погребения 1355 курганного могильника «Братские Первые курганы» значительно различались по соотношению липаз и эстераз. В грунте из миски была выявлена высокая доля активности эстераз – более 40% от суммы, а также максимальный вклад активности липазы С16. В грунте из кувшинчика активность эстераз не превышала 30% от суммарной активности, а наибольшей активностью отличалась липаза С-18.

Кувшин и кружка, принадлежавшие женщине из семейного погребения 1452 могильника «Братские Первые курганы», а также кувшин-подношение, найденный у входа этого катакомбного погребения, имели свои особенности в соотношении активности липолитических ферментов. Наименьшей суммарной активностью и наибольшей долей активности эстеразы С4 отличался грунт из кувшина. Грунт из кружки обладал максимальной липолитической активностью среди всех изученных сосудов аланской культуры. Здесь при близком соотношении активности истинных липаз уменьшалась доля активности липолитических ферментов С4 и С12 и увеличивалась доля активности ферментов С8 и С14. В грунте из кувшина-подношения не выявлялась активность ли-



**Рис. 3.** Кластеризованная тепловая карта активности липолитических ферментов в грунте со дна некоторых сосудов из древних погребений. Красным цветом обозначены сосуды из курганного могильника «Литвиновский-III» (эпоха бронзы), синим – «Братские Первые курганы» (аланская культура).

пазы C12. По соотношению активности остальных ферментов этот кувшин имел максимальное сходство с кружкой внутри погребения, за исключением более высокой активности липазы C18. Посуда из погребения 1452 входит в одну группу (рис. 1), где предполагается исходное присутствие молочного жира. При этом кувшин-подношение 9 и детская миска 10 из соседней группы начинают ряд с максимальной активностью липазы C18. Из грунта сосудов аланской культуры (рис. 2) выделены бактерии, способные к сбраживанию молока.

Для этой же группы сосудов показано значительное отставание активности липазы C12 от остальных липолитических ферментов (рис. 3) и группировка большей части сосудов по погребениям, за исключением женского кувшина из погребения 1452, имеющего наиболее близкое сходство с детским кувшинчиком из погребения 1355 по низкой активности эстеразы C8 и липазы C14.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате кластерного анализа липолитической активности в грунте дна горшков из древних погребений были выявлены варианты с различным соотношением эстераз и липаз. Две группы горшков показывали предельно низкие значения эстеразной активности почвенного микробного сообщества на фоне максимальной активности липаз C18 и C12, что может быть связано с ингибированием эстераз в присутствии высоких концентраций жирных кислот. В трех группах горш-

ков наблюдалась эстеразная активность на фоне высокой относительной активности липаз C16, средней относительной активности липаз C18 и предельно низкой активности истинных липаз. Группировка горшков по соотношению липазной и эстеразной активности отражает характеристики их исходного содержимого, тогда как абсолютные значения активности ферментов, среди избранной посуды с наибольшей суммарной липолитической активностью, могут быть сгруппированы в соответствии с типом погребения. Таким образом, оценка баланса липазной и эстеразной активности дает полезную информацию для реконструкции исходного содержания пищи в погребальных сосудах.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарности археологу В.Ю. Малашеву (Институт археологии РАН, Москва) за предоставленные образцы выборки.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-28-01725 «Почвенно-микробиологические, энзимологические и молекулярно-биологические подходы к идентификации пищи в сосудах из погребений», рук. Н.Н. Каширская).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит экспериментов с использованием людей и животных в качестве объектов исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- R. P. Evershed, *Archaeometry*, **50**, 895 (2008). DOI: 10.1111/j.1475-4754.2008.00446.x
- L. J. Cramp, I. D. Bull, E. Casanova, et al., in *Lipids in Archaeology. Handbook of Archaeological Sciences* (2023), V. 1, p. 529
- A. Irto, G. Micalizzi, C. Bretti, et al., *Molecules*, **27** (11), 3451 (2022).
- M. S. Copley, F. A. Hansel, K. Sadr, and R. P. Evershed, *South Afr. J. Sci.*, **100** (5), 279 (2004).
- R. P. Evershed, S. N. Dudd, M. S. Copley, et al., *Accounts Chem. Res.*, **35** (8), 660 (2002).
- S. Hammann, D. J. Scurr, M. R. Alexander, and L. J. Cramp, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **117** (26), 14688 (2020).
- M. P. Colombini, F. Modugno, and E. Ribechini, *J. Mass Spectrometry*, **40** (7), 890 (2005).
- M. Bondetti, et al., *Archaeometry*, **63** (3), 594 (2021).
- M. S. Copley, P. J. Rose, A. Clapham, et al., *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.*, **268** (1467), 593 (2001).
- R. Sacchi, et al., *Science of Food*, **4** (1), 19 (2020).
- S. N. Dudd, R. P. Evershed, and A. M. Gibson, *J. Archaeol. Sci.*, **26** (12), 1473 (1999).
- E. Casanova, T. D. Knowles, C. Ford, et al., *Radiocarbon*, **62** (6), 1679 (2020).
- Н. Н. Каширская, Л. Н. Плеханова, С. Н. Удальцов и др., *Биофизика*, **62** (6), 1235 (2017). DOI: 10.1134/S0006350917060094
- Н. Н. Каширская, Л. Н. Плеханова, Е. В. Чернышева и др., *Почвоведение*, № 1, 89 (2020). DOI: 10.1134/S0032180X20010098.
- M. W. I. Schmidt, M. S. Torn, S. Abiven, et al., *Nature*, **478**, 49 (2011).
- В. М. Семенов, А. С. Тулина, Н. А. Семенова и Л. А. Иванникова, *Почвоведение*, № 4, 393 (2013). DOI: 10.7868/S0032180X13040114
- M. Von Lützw, I. Kögel—Knabner, B. Ludwig, et al., *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **171**, 111 (2008).
- В. А. Намиот, А. В. Батяновский, И. В. Филатов и др., *Биофизика*, **61** (1), 54 (2016).
- Е. В. Чернышева, М. А. Амирян, М. В. Ельцов и др., *Ethnography*, **18** (4), 993 (2022).
- Е. В. Чернышева, Н. Н. Каширская и К. С. Душанова, *Вестн. археологии, антропологии и этнографии*, № 2 (61), 113 (2023).
- L. Casas-Godoy, S. Duquesne, F. Bordes, et al., *Methods Mol. Biol.*, **861**, 3 (2012). DOI: 10.1007/978-1-61779-600-5\_1
- А. М. Безбородов и Н. А. Загустина, *Прикладная биохимия и микробиология*, **50** (4), 347 (2014).
- F. Akram, A. S. Mir, and A. Roohi, *Mol. Biotechnol.*, **65**, 521 (2023). DOI: 10.1007/s12033-022-00592-z
- T. C. A. Hitch and T. Clavel, *PeerJ.*, **7**, e7249 (2019). DOI: 10.7717/peerj.7249
- В. С. Гамаюрова, К. Л. Шнайдер и М. Е. Зиновьева, *Вестн. Казанского технологич. ун-та*, **17** (24), 175 (2014).
- A. Glogauer, V. P. Martini, H. Faoro, *Microb. Cell Fact.*, **10**, 54 (2011). DOI: 10.1186/1475-2859-10-54
- P. Tirawongsaroj, R. Sriprang, P. Harnpicharnchai, et al., *J. Biotechnol.*, **133** (1), 42 (2008). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.08.046
- M. Parapouli, A. Foukis, P. Y. Stergiou, et al., *J. Biol. Res.-Thessaloniki*, **25**, 4 (2018). DOI: 10.1186/s40709-018-0074-6
- Е. В. Чернышева, А. В. Борисов и В. Ю. Малашев, *Краткие сообщения Института археологии*, № 263, 105 (2021). DOI: 10.25681/IARAS.0130-2620.263.105-116
- Н. Н. Каширская, Е. В. Чернышева и В. Ю. Малашев, *История, археология и этнография Кавказа*, **19** (1), 150 (2023).
- Т. Э. Хомутова, Т. С. Демкина, А. В. Борисов и Н. И. Шишлина, *Почвоведение*, № 2, 239 (2017). DOI: 10.7868/S0032180X1702006X
- Л. Н. Плеханова, С. Н. Удальцов, А. С. Сыроватко и Н. Н. Каширская, *Биофизика*, **68** (5), 999 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923050204
- L. N. Plekhanova, in *Proc. 19th Int. Multidisc. Sci. Geocnf. SGEM 2018*, **18** (5.2), 173 (2018). DOI: 10.5593/sgem2018/5.2/S20.023
- T. E. Khomutova and A. V. Borisov, *J. Arid Environ.*, **171**, 104004 (2019). DOI: 10.1016/j.jaridenv.2019.104004
- В. А. Демкин, Т. С. Демкина и С. Н. Удальцов, *Вестн. археологии, антропологии и этнографии*, № 2 (25), 148 (2014).
- C. Ruiz, S. Falcocchio, E. Xoxi, et al., *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*, **1672** (3), 184 (2004).
- J. L. Smith and J. A. Alford, *Appl. Microbiol.*, **14** (5), 699 (1966).
- P. Nobmann, A. Smith, J. Dunne, et al., *Int. J. Food Microb.*, **128** (3), 440 (2009).
- C. Q. Sun, C. J. O'Connor, and A. M. Robertson, *Chem.-biol. Interactions*, **140** (2), 185 (2002).
- C. Zhong, N. Zhu, Y. Zhu, et al., *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, **141**, 105123 (2020).
- K. Sugimoto, H. Tanaka, R. Moriyama, *Biocontrol Sci.*, **3** (1), 17 (1998).
- J. Lalman and D. M. Bagley, *Water Res.*, **36** (13), 3307 (2002).
- C. S. Hwu, S. K. Tseng, C. Y. Yuan, et al., *Water Res.*, **32** (5), 1571 (1998).

44. J. Palatsi, M. Laurenzi, M. V. Andrés, et al., *Bioresource Technol.*, **100** (20), 4588 (2009).
45. M. A. Pereira, O. C. Pires, M. Mota, and M. M. Alves, *Biotechnology Bioengineering*, **92** (1), 15 (2005).
46. J. Palatsi, M. Viñas, M. Guivernau, *Bioresource Technol.*, **102** (3), 2219 (2011).
47. S. M. Iskander, Y. M. Amha, P. Wang, et al., *Front. Bioengineering Biotechnol.*, **9**, 613626 (2021).
48. Z. Guo, M. Usman, S. A. Alsareii, et al., *Bioresource Technol.*, **337**, 125383 (2021).
49. H. Wang, Q. Yan, X. Zhong, et al., *Bioresource Technol.*, **386**, 129538 (2023).
50. S. Amir, G. Merlina, E. Pinelli, et al., *J. Hazardous Mater.*, **159** (2–3), 593 (2008).
51. R. Gaur, R. Hemamalini, and S. Khare, in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Ed. by A. N. S. Pandey and C. R. Soccol (Elsevier, 2017), p. 175.
52. В. Ю. Малашев, Р. Г. Магомедов, Ф. С. Дзурев и др., *Археологические открытия*, **2018**, 342 (2020).
53. Д. С. Коробов, В. Ю. Малашев, и Й. Фассбиндер, *Краткие сообщения Института археологии*, № 260, 441 (2020).
54. A. Cowie, V. E. Lonergan, F. S. M. Rabbi, et al., *Soil Res.*, **51**, 707 (2013). DOI: 10.1071/SR13043
55. A. J. Margenot, Y. Nakayama, and S. J. Parikh, *Soil Biol. Biochem.*, **125**, 350 (2018). DOI: 10.1016/j.soilbio.2017.11.006
56. S. Zhao, Y. Guo, Q. Sheng, and Y. Shyr, *BioMed Res. Int.*, **2014**, 986048 (2014). DOI: 10.1155/2014/986048
57. Д. А. Белинская и Н. В. Гончаров, *Биоорганическая химия*, **46** (3), 247 (2020). DOI: 10.31857/S0132342320030045

### Lipase and Esterase Activity in Soils from Ancient Burial Vessels

N.N. Kashirskaya\*, E.V. Chernysheva\*, S.N. Udaltsov\*, and L.N. Plekhanov\*

*\*Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

The activity of lipolytic enzymes was assessed using the microplate method using heteromolecular exchange in soils from the bottom of burial vessels, followed by cluster analysis. Groups with a contrasting ratio of lipases C12 – C18 and esterases C4 – C8 were identified in a sample that included 57 burial pots aged two to three thousand years. The total lipolytic activity of soil samples from dishes with the presumptive initial presence of fat-containing food products was above 6% of the maximum value within the sample. Inhibition of esterases in the presence of high concentrations of fatty acids is reflected in the extremely low relative values of esterase activity of the soil microbial community against the background of maximum activity levels of C18 and C12 lipases in two groups of pots. In three groups, esterase activity was observed against the background of high relative activity of C16 lipases, average relative activity of C18 lipases and extremely low activity of true lipases. In the group of pots with high total lipolytic activity (with the exception of certain extreme values of this indicator), the proportion of true lipase activity was 1.7–1.8 times higher compared to the proportion of esterase activity. The grouping of burial vessels by the ratio of lipase and esterase activity reflects the characteristics of the funeral food, while the absolute values of enzyme activity among selected vessels with the highest total lipolytic activity are grouped according to the type of burial.

*Keywords: lipolytic enzymes, lipase, esterase, fatty acids, funerary vessels, dishes, pots, funeral food, ancient food, Bronze Age, early Iron Age*