

Tomáš Erban a kol.

# **Metodika pro identifikaci cizích amyláz v medu**



**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

2021

---

# Metodika pro identifikaci cizích amyláz v medu

certifikovaná metodika

---

**Tomáš Erban a kol.**

---

Autorský kolektiv

**Tomáš Erban**<sup>Φ</sup> 

**Elena Shcherbachenko**<sup>Φ</sup>

**Pavel Talacko**<sup>Θ</sup>

**Karel Harant**<sup>Θ</sup>

---

<sup>Φ</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6-Ruzyně

<sup>Θ</sup>Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Průmyslová 595, 252 50 Vestec

 RNDr. Tomáš Erban, Ph.D., arachnid@centrum.cz; erban@vurv.cz



PŘÍRODOVĚDECKÁ  
FAKULTA  
Univerzita Karlova



BIOCEV

## Oponenti:

**Ing. Soňa Baršová** – Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Inspektorát v Praze

**Prof. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.** – Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii; Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova

## Vydal:

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2021

ISBN 978-80-7427-356-8

### **Financování:**

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. **QK1820088**. Výsledek byl spolufinancován z Výzkumného záměru Ministerstva zemědělství ČR č. **RO0418**.

### **Určení pro využití v praxi:**

Metodika je určena laboratořím, které se zabývají analýzou kvality medu. Cílovou skupinu představují především laboratoře zaměřené na prokazování falšování medu a hodnocení jeho jakosti. Tato metodika umožňuje identifikaci různých amyláz, které mohly být do vzorku přidány procesem falšování a nejsou pravému včelímu medu vlastní. Hlavním cílovým uživatelem v Česku je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), která v Česku provádí kontroly medů. Dalším cílovým uživatelem ze státního sektoru je Státní veterinární správa (SVS), která se kontrolou medu také zabývá. Využití metodiky je však také ve výuce a budoucí praxi oborů přírodovědných, veterinárních, chemických i lékařských na univerzitách. V neposlední řadě jsou výsledky, které lze aplikací metodiky v praxi získat, ku prospěchu poctivým včelařům a obchodníkům.

### **Certifikace:**

Metodice bylo uděleno osvědčení MZe ČR č. **SML/192/21/003 (17/2021)**.

O uplatnění metodiky je uzavřena smlouva č. **QK1820088/Nmet1 (3/2021)** podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku.

Oponentní posudky vypracovali Ing. Soňa Baršová a prof. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

### **Prohlášení:**

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

### **Poděkování:**

Autoři děkují Martinu Markovičovi a Mgr. Julii Chalupníkové za technickou pomoc. Autorský tým děkuje také recenzentům metodiky za podnětné a cenné připomínky.

**Anotace:**

Včelí med je unikátní přírodní produkt. Med je odedávna využíván jako lahodná sladká potravina. Je však ceněn také pro mnohostranné léčivé účinky. Med bohužel patří mezi nejfalšovanější potraviny. Do medu nesmí být nic přidáváno a nesmí být upravován. S medem je také potřeba zacházet opatrně, protože jeho kvalitu může negativně ovlivnit způsob zpracování. Med může výrazně ovlivnit nešetrné rozechřívání. I přes velký pokrok v analytických metodách se nedaří prokázat všechny falšované medy. Některé způsoby falšování jsou totiž dosti sofistikované. Proto je potřeba hledat nové přístupy a metody pro odhalování falšování medu. Aby mohl být med prodáván, musí splňovat mezinárodně platné normy, které platí také na národních úrovních s případnými modifikacemi. Jedním z důležitých parametrů pro med je míra diastázové neboli amylázové enzymové aktivity, která je uznávaným indikátorem čerstvosti a kvality medu. Snížená diastázová aktivita pod stanovenou normu může indikovat starý med, ale může být také důsledkem nešetrného zacházení s medem. V neposlední řadě může být diastázová aktivita snížena v důsledku falšování medu, jako je jeho ředění cukernými náhražkami. Někdy může být amylázová aktivita uměle nastavena přidáním enzymů. Takto falšovaný med sice splní stanovené legislativní požadavky pro uvedení na trh, ale nastavením amylázové aktivity je porušen zákaz o přidávání látek do medu. Dosud používané metody neumožňovaly odhalení takového způsobu falšování. Proto se tato metodika zaměřuje právě na specifickou identifikaci cizích amyláz, které se mohou v medu vyskytovat. Metodika umožňuje identifikovat bottom-up shotgun proteomickým přístupem prakticky jakoukoliv cizí amylázu v medu. Identifikované specifické peptidy získané na základě tohoto metodického postupu mohou být později využity pro vývoj cílené metody pro identifikaci cizích amyláz.

## **Annotation:**

### **A method for identification of foreign amylases in honey**

Honey is a unique natural product. Honey has been used as a sweet and delicious foodstuff since ancient times. However, it is also valued for its multifaceted curative properties. Unfortunately, honey is one of the most adulterated foods. Nothing may be added to or modified from the honey. Honey also needs to be handled with care. Honey quality can negatively be affected by the way of processing such as heating and storage. Despite great progress in analytical methods, it is not possible to prove all adulterated honeys. Some methods of adulteration are quite sophisticated. Therefore, it is necessary find new approaches and methods for identification of honey adulteration. To be sold, honey must comply with internationally valid standards, which are also valid at national levels with possible minor modifications. One of the important parameters for honey is the level of diastase or amylase enzyme activity, which is a recognized indicator of the freshness and quality of honey. Lower diastase activity below the established level may indicate old honey, but it may also be the result of careless handling of honey. Last but not least, diastase activity may be reduced due to adulteration of honey such as its dilution with sugar substitutes. It is possible that amylase activity can be artificially adjusted by the addition of enzymes. Honey adulterated by the artificially added amylase meets the legislative requirements for placing honey on the market, but this violates the rules laid down by law. The methods used so far have not made it possible to prove this way of honey adulteration. Therefore, this methodology focuses on the identification of foreign amylases that may occur in honey. The methodology enables to identify practically any foreign amylase in honey by bottom-up shotgun proteomic approach. Based on the obtained results with specific peptides can be further used for the development of a targeted method for the identification of foreign amylases.

## Obsah

1. Cíl.....	- 1 -
2. Úvod do problematiky kvality medu.....	- 1 -
3. Diastázová aktivita – faktor kvality medu.....	- 2 -
4. Proteiny v medu a pozice včelí amylázy v proteomu medu.....	- 3 -
5. Medu vlastní amylázy a cizí amylázy .....	- 5 -
6. Vlastní popis metodiky .....	- 6 -
6.1. „Bottom-up“ shotgun proteomika .....	- 6 -
6.2. Vhodně zvolená databáze a specifita peptidů .....	- 7 -
6.3. Principiální základ metodiky.....	- 8 -
6.4. Metodický postup identifikace cizí amylázy a ověřovací kroky .....	- 13 -
6.4.1. Správná volba databáze důležitější volby softwaru.....	- 13 -
6.4.2. Volba databáze zaměřená na cizí amylázy .....	- 13 -
6.4.3. Referenční databáze – medu vlastní proteiny z <i>A. mellifera</i> a proteiny z dalších přírodních zdrojů .....	- 14 -
6.4.4. Ověření správnosti identifikace cizí amylázy – specifita aminokyselin .....	- 16 -
6.4.5. Ověření, že cizí amylázu neprodukoval do medu mikroorganismus.....	- 16 -
6.5. Schématické znázornění metodiky .....	- 18 -
7. Srovnání novosti metodiky.....	- 19 -
8. Uplatnění metodiky .....	- 19 -
9. Ekonomické zhodnocení metodiky .....	- 19 -
10. Publikace, které předcházely metodice.....	- 20 -
11. Seznam literatury .....	- 21 -

## 1. Cíl

Cílem metodiky je přispět novým metodickým postupem k identifikaci falšovaného medu. Metodika je zaměřena na odhalení způsobu falšování medu, který spočívá v přidání cizích amyláz do medu, čímž je kompenzována diastázová aktivita. Cílem je poskytnout uživatelům postup, který bude použitelný na přístrojovém hardwaru zahrnující vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr s kapalinovou chromatografií a vyhodnocovací software od různých dodavatelů. Metodika umožňuje specifickou identifikaci prakticky všech možných amyláz nacházejících se v daném vzorku medu, pro něž existuje sekvence. Metodika umožňuje identifikaci spektra amyláz, které nejsou pravému medu vlastní. Současně však umožňuje identifikaci proteinů ze včel, ale i dalších proteinů, které jsou medu vlastní.

## 2. Úvod do problematiky kvality medu

Med je přírodním produktem včely medonosné. Med je velmi ceněná a také vychvalovaná potravina, která je běžně používána v řadě domácností. Kromě vysoké potravinové hodnoty je med také znám svými léčebnými účinky, které znali již naši dávní předci. Léčivé účinky různých typů medu popisuje odedávna ájurvédská medicína [1]. Med má různé využití i v moderní medicíně. Nejznámější jsou jeho antimikrobiální účinky [2] a dokonce je účinný i proti multirezistentním mikroorganismům [3, 4]. Podle britského Národního institutu pro zdraví a klinickou kvalitu (anglicky: National Institute for Health and Care Excellence; NICE) může být užívání medu proti onemocněním horních dýchacích cest a akutní bronchitidě prostředkem, který by mohl pomoci snížení spotřeby antibiotik. To by v konečném důsledku mohlo pomoci pro snížení antibiotické rezistence mikroorganismů, která je globální hrozbou naší civilizace [5]. Další medicínální využití medu je při léčbě popálenin a při hojení ran [6–8], v dentální hygieně [9] nebo dokonce v aplikacích proti rakovině [9].

Unikátnost včelího medu jako přírodního produktu je velmi závislá na kvalitě a také původu. Med je bohužel velmi často falšovanou komoditou a této problematice je věnována mezinárodně značná pozornost [10]. Med je obecně považován za komplikovanou matici pro analýzy. Obsahuje totiž velký obsah cukrů a také řadu různých látek, na jejichž variabilitě se odráží podstatnou měrou botanický původ medu. Zásadním faktorem, který může ovlivnit kvalitu medu, je způsob zpracování, skladování a různé způsoby falšování. Falšování je prováděno zejména přidáváním

různých cukerných roztoků a sirupů. Med je také často nesprávně označován na etiketě [10–13]. Mezinárodně platná kritéria kladená na med, který může být prodáván, jsou uvedena především v Codex Alimentarius (česky: potravinové regule), který spravuje Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů (FAO) a Světová zdravotnická organizace (WHO) [14, 15]. Tato pravidla zakotvená v dokumentu Codex Alimentarius Standard pro med převzala také Evropská komise (EK) a zakotvila je ve směrnici Rady 2001/110/ES [16], která byla později změněna přijetím směrnice 2014/63/EU [17]. Pravidla jsou závazná pro členské země Evropské unie (EU).

### **3. Diastázová aktivita – faktor kvality medu**

Důležitým parametrem kvality medu z hlediska legislativy je jeho diastázová neboli amylázová aktivita, která je tradičně považována za indikátor čerstvosti medu [14, 18, 19]. Podle směrnice Rady 2001/110/ES [16] a její novelizované směrnice Rady 2014/63/EU [17] musí mít med diastázovou aktivitu podle Schadeho stupnice nejméně 8. Pro některé druhy medu platí mírnější kritérium. Takovým případem jsou medy s nízkým obsahem přirozených enzymů, jako jsou medy citrusové a medy s obsahem hydroxymethylfurfuralu (HMF) nejvýše 15 mg/kg. V těchto případech může mít diastázová aktivita hodnotu 3 dle Schadeho stupnice [16]. Pokud med nespĺňuje parametry kladené na diastázovou aktivitu, nesmí být prodáván k přímé konzumaci. Tato kritéria nejsou kladena na pekařský med. Pekařský med (zvaný též průmyslový med) není vzhledem ke zhoršeným jakostním parametrům určen k přímé konzumaci a jeho využití je na pečení a vaření.

Kromě přirozené variability může být diastázová aktivita v medu snížena z několika jiných důvodů. Jednou z možných příčin je, že se jedná o starý med. Diastázová aktivita může být snížena také z důvodu nešetrného zahřívání [19]. Další pravděpodobnou příčinou snížené enzymové aktivity je, že med byl naředěn. Nejčastější je nastavení cukernou náhražkou sirupem [10–13, 20]. Pokud klesne diastázová aktivita z jakéhokoliv důvodu pod povolený limit, nesmí být produkt prodáván k přímé konzumaci. Pak je riziko, že by mohla být diastázová aktivita dodatečně nastavena přidávkem enzymů, které můžeme nazývat cizí amylázy [21]. Tento způsob falšování medu není zjištělný dosud používanými postupy, které zahrnují enzymové stanovení. Pro odlišení přirozeně se vyskytující amylázy v medu a amyláz, které nejsou pravému včelímu medu vlastní, je vhodný proteomický přístup s detekcí založenou na hmotnostní spektrometrii [22]. Proteomický přístup je principiálně aplikovatelný při prokazování autenticity různých potravin [23–25].



#### 4. Proteiny v medu a pozice včelí amylázy v proteomu medu

Jednou z důležitých komponent medu jsou proteiny. Obsah proteinů v medu se pohybuje většinou v jednotkách desetin procenta a v některých případech přesahuje procento. Jejich význam je však skutečně značný, jelikož se podílejí na konečném složení medu a na jeho vlastnostech. Některé enzymy přetvářejí složky medu jako cukry a utvářejí dokonce jeho fyzikální vlastnosti. Proteiny v medu představují poměrně malý podíl, zejména pokud jejich obsah srovnáme s cukry (zejm. glukóza a fruktóza). Právě velký obsah cukrů znesnadňuje přímou analýzu proteinů v medu [22, 26, 27]. Nejprve se studie zaměřené na proteiny v medu zabývaly jejich jednotlivými reprezentanty. Zprvu se analýzy zaměřovaly zejména na enzymy, jejichž aktivitu bylo možno ověřit enzymovými substráty. Včelí proteiny v medu by měly pocházet zejména z hypofaryngeálních žláz dělnic, které med v podstatě vyrábějí. Za hlavní včelí enzymy v medu lze označit glukóza oxidázu, invertázu (alfa-glukosidázu III) a také alfa-amylázu [28–31]. Pozornost po mnoho desetiletí poutá také katalázová aktivita v medu, jejíž původ je dlouhodobě považován za nejasný a není připisován včelím proteinům [32, 33]. Nejabundantnějším proteinem včelího medu je major royal jelly protein 1 (MRJP1), jehož identita byla ověřena proteomickým přístupem. Tento protein je současně hlavním a nejabundantnějším proteinem jiného včelího produktu, mateří kašičky [34].

Pokrok v analytických metodách, které využívá vysokokapacitní proteomika, umožnil identifikaci dalších proteinů v medu. Pomocí kombinace dvourozměrné elektroforézy (2D-E) s následnou identifikací spotů tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) byly v medu identifikovány nejabundantnější proteiny, z nichž lze jmenovat zejména včelí MRJP1-5, invertázu, glukóza oxidázu a třeba také antimikrobiální peptid defensin-1. Byla však také snaha identifikovat rostlinné proteiny, i když zprvu neúspěšně [35, 36]. V 2D-E byla v medech indikována také aktivita serinových proteáz [36]. Některé další studie, které využily jiného analytického přístupu, který je založen na bezgelové proteomické analýze pomocí LC-MS/MS, identifikovaly další včelí proteiny v medu [37, 38]. Studie se však vyznačovaly zčásti nescifickými identifikacemi, což bylo způsobeno také nevhodným použitím prohledávací databáze [22].

Později následovala detailní charakteristika včelích proteinů v medu, kterou přinesla studie s přečištěním vzorků medu na základě size exclusion chromatografie a využitím LC-MS/MS analýzy s použitím tribridního hmotnostního spektrometru Orbitrap Fusion. Ve studii provedené

na 13 pravých medech bylo identifikováno 119 proteinových hitů (pozn. identifikací proteinů, které však nemusí nutně odpovídat počtu proteinů), které taxonomicky odpovídaly včelím proteinům. Toto spektrum identifikací bylo po vyfiltrování tzv. stopových identifikací zúženo na 71 proteinových hitů, mezi nimiž je spektrum proteinů identifikovaných prakticky v každém medu a spektrum proteinů identifikovatelných jen v některých vzorcích. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že zastoupení přibližně 30 hlavních včelích proteinů v medu je poměrně stabilní z pohledu jeho proteomu. Odlišnosti mezi medy však činí jednotlivé méně abundantní včelí proteiny nebo antimikrobiální peptidy [27]. Tato studie nezahrnovala bioinformatickou analýzu jiných, než včelích proteinů. Na další proteiny v medu se však zaměřila pozdější publikace s použitím stejné technologie analýzy a přípravy vzorku. Ve studii však byly kromě zaručeně autentických medů zahrnuty také medy zakoupené v obchodech nejen z Česka, ale i ze zahraničí z Evropy a Ameriky [22]. Z hlediska spektra včelích proteinů v medu byly výsledky vcelku podobné předchozí studii Erban et al. [27]. Pro zvýšení komplexnosti reportovaných dat bylo cíleno vyhodnocení také na proteiny rostlinného původu a proteiny, které by mohly pocházet ze mšic jakožto klíčových producentů medovice. Analýza však byla navíc zaměřena na identifikaci cizích amyláz v medu [22]. Obě tyto klíčové proteomické studie medu ([22] a [27]) byly realizovány autorským týmem této metodiky.

Bioinformatická identifikace různých proteinů pocházejících z mnoha potenciálních organismů v tak komplexním a často variabilním vzorku, jako je med, je poměrně komplikovaná. To platí zejména pro vícedruhový med, protože včely mohou sbírat nektar a pyl, ale i medovici z mnoha různých zdrojů. Pro med vytáčený ze včelstva nebo včelstev z určité včelnice záleží na lokalitě a ročním období. Pokud je med smíchán od různých dovatelů, je situace ještě komplikovanější.

Prakticky důležitým výsledkem proteomické studie [22], která zahrnovala 45 medů různého původu, byla úspěšná identifikace 3 různých cizích amyláz ve čtyřech vzorcích medu. Identita cizích amyláz byla po ověření identifikací přiřazena mikrobiálním alfa-amylázám *Aspergillus niger*, *Bacillus licheniformis* a *Bacillus amyloliquefaciens*. Beta- ani gama-amylázy nebyly identifikovány. Identifikované cizí alfa-amylázy jsou běžně používané v potravinářském průmyslu. Studie poskytla také identifikované hlavní skupiny rostlinných proteinů, jejichž původ lze přiřadit zejména nektaru, ale také pylu rostlin. Dále byl reportován potenciál pro identifikaci proteinů

z hmyzu produkujícího medovici [22]. V neposlední řadě bylo potvrzeno [22], že katalázy nejsou včelího původu, ale mohou být mikrobiálního či rostlinného původu [32, 33]. Podstatné je také zjištění, že rostlinné proteiny v rozpustné proteinové frakci medu sice představují poměrně významnou část proteinů. Nejabundantnější identifikované rostlinné proteiny lze na základě bottom-up proteomické analýzy přiřadit přibližně na 20. místo v pořadí mezi včelími proteiny [22].

Obě recentní vysokokapacitní proteomické studie [22, 27] ukazují, že pomocí bottom-up proteomické analýzy proteinů štěpených trypsinem je možné v medu identifikovat nejen celou řadu včelích proteinů a další medu vlastní proteiny, ale i proteiny, které by ve včelím medu být správně neměly. Takovými proteiny jsou cizí amylázy [21]. Včelí alfa-amylázy, které jsou naopak včelímu medu vlastní, nejsou sice ty úplně nejabundantnějšími proteiny medu, ale patří mezi proteiny, které jsou spolehlivě detekovatelné v každém vzorku medu. Nebo by tomu aspoň tak mělo být [22, 27].

## **5. Medu vlastní amylázy a cizí amylázy**

Medu vlastní amylázy jsou především ty, které do něj produkují včelí dělnice. Jsou jimi alfa-amylázy, které jsou produkovány hypofaryngeálními žlázami dělnic, což potvrdila funkční studie na expresní úrovni [28] i proteomická analýza hypofaryngeálních žláz [39–41]. Z kvalitativního hlediska je v podstatě poměrně velká shoda mezi řadou proteinů v medu a proteiny identifikovanými v mateří kašičce [22, 27, 41]. Včelí alfa-amyláza byla purifikována z medu [42] a také byla charakterizována na enzymové úrovni. Chování amylázy a také stabilita v medu jsou však odlišné od její purifikované formy. Bylo zjištěno, že teplotní stabilita alfa-amylázy purifikované z medu byla stabilizována v prostředí se škrobem, což může mít potenciální využití v biotechnologii. Takové prostředí však v medu není [43, 44], a proto se jedná o poznatek, který nelze aplikovat na med. Relevantní poznatky jsou však takové, které se týkají teplotní stability medu vlastní amylázy. Studie uvádějí, že včelí amyláza v medu dokáže být odolná proti zahřívání. Babacan et al. [45] uvádí, že alfa-amyláza dokáže odolat teplotě 85 °C po dobu 11 min. Amylázová/diastázová aktivita v medu má různý poločas životnosti, který může být při pokojové teplotě kolem 20 °C řádově několik desítek měsíců či dokonce několik let. Stabilita enzymové aktivity však podstatně klesá s vyšší teplotou. Při teplotě kolem 40 °C se poločas stability diastázové aktivity snižuje na desítky dnů a při 60 °C může být aktivita eliminována na polovinu již během jediného dne [46, 47].

Cizí alfa-amylázy, které se do medu dostanou procesem falšování, budou s nejvyšší pravděpodobností ty, které jsou používány v potravinářství, jako je *A. niger*, resp. *Aspergillus oryzae* [21], což potvrdila také proteomická studie [22]. Ta však indikovala možnost přítomnosti i jiných mikrobiálních amyláz, konkrétně alfa-amyláz z bakterií *B. amyloliquefaciens* a *B. licheniformis*. Cizí amylázy se mohou ve vzorku vyskytovat dokonce v kombinaci, což bylo indikováno pro společnou přítomnost alfa-amyláz z *A. niger* a *B. amyloliquefaciens* v jistém vzorku medu [22]. Tyto alfa-amylázy jsou komerčně dostupné a využívají se v potravinářském průmyslu. Jejich využití je také při produkci sirupů [48, 49]. Otevřenou otázkou však zůstává, zda byly do medu záměrně přidány samotné amylázy nebo zda se mohly tyto amylázy do medu dostat při ředění medu sirupem s obsahem amyláz [22].

## **6. Vlastní popis metodiky**

### **6.1. „Bottom-up“ shotgun proteomika**

V principu rozlišujeme dva proteomické přístupy pro proteinovou a peptidovou analýzu, které jsou nazývány bottom-up a top-down proteomika. V případě top-down přístupu je protein nejprve izolován ze směsi a pak přímo fragmentován (MS/MS) v hmotnostním spektrometru [50]. V případě bottom-up proteomiky je protein nejprve proteolyticky štěpen na peptidy a ty jsou pak fragmentovány (MS/MS). Nejčastěji je ke štěpení používán trypsin [51], který štěpí peptidové vazby specificky za basicnými aminokyselinami lysinem (Lys) a argininem (Arg) [52]. V případě bottom-up shotgun proteomiky je směs proteinů ve vzorku enzymově naštěpena a poté jsou peptidové fragmenty ze směsi separovány a následně MS/MS fragmentovány v hmotnostním spektrometru a poté identifikovány [53]. Tento přístup je aplikován v této metodice. Konkrétně je využíváno přístupu shotgun label-free proteomiky pro identifikaci a kvantifikaci proteinů [53–56].

Při analýze může být využito technologií různé kvality a od různých výrobců, s čímž souvisí také různý princip hmotnostního detektoru. Pokroky v hmotnostní spektrometrii, separačních a frakcionačních metodách umožňují čím dál více identifikací již ve velmi malém objemu vzorku. Rozdíl v použitých technologiích se v konečném důsledku projeví na počtu identifikací. Jako separační technologie je s výhodou využíváno nanoLC místo konvenčních LC, kterých je však možné také využít [57]. Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda, která byla poprvé aplikována již před více než 110 lety. Hmotnostní analyzátoři umožňují rozlišení iontů produkovaných v iontovém zdroji na základě poměru hmotnosti a náboje, tedy  $m/z$ . Hmotnostní

spektrometry doznaly obrovského pokroku [58]. Dnes existuje několik typů hmotnostních analyzátorů využívaných ve vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrii (HRMS). Využívají různých fyzikálních principů. Některé přístroje s výhodou kombinují dokonce více hmotnostních analyzátorů. Zejména je využívána kombinace s kvadrupólovým analyzátozem [59].

## 6.2. Vhodně zvolená databáze a specifita peptidů

Zásadní pro správnou identifikaci proteinů z dat naměřených LC-MS/MS technologií je vhodně zvolená prohledávací databáze. Získaná data shotgun metodologií jsou obvykle velmi objemná. Při bioinformatickém zpracování jsou peptidům přiřazovány identity na základě zdrojové databáze. Je nutno si uvědomit, že identifikovány jsou pouze ty peptidy a následně proteiny, které jsou zahrnuty v prohledávací databázi. Volba vhodné databáze je proto velmi důležitá a může velmi podstatným způsobem ovlivnit reportované výsledky, a to pokud se jedná o jejich kvalitu a správnost identifikací.

Na jednu stranu je potřeba, aby databáze zahrnovala takové proteinové sekvence, které co nejvíce odpovídají těm, které ve vzorku očekáváme. Při konstrukci databáze je tedy snaha, aby byla co nejkompletnější. Ideální databáze by obsahovala sekvence všech proteinů přítomných ve vzorku. Databáze obvykle odpovídá sekvencím odvozeným z genomu daného organismu, pokud je genom znám. Pokud není znám genom a je k dispozici transkriptom, je i ten vhodným alternativním zdrojem pro tvorbu databáze [60, 61]. V některých případech je však vhodné databázi obohatit o další sekvence. Příkladem můžou být různé mikroorganismy asociované se včelou medonosnou nebo také jeho parazitickým roztočem *Varroa destructor* [62, 63]. Při použití příliš mnoha sekvencí však stoupá riziko namapování peptidů na proteiny, které se ve vzorku ve skutečnosti nevyskytují, ale mají část sekvence shodnou s proteinem ve vzorku přítomném. Rovněž klesá počet spekter, které je možné identifikovat vzhledem ke statistické přirozenosti vyhledávacího procesu [64, 65]. Vždy existuje riziko, že dojde k nějakým falešně pozitivním identifikacím. V případě některých vzorků je toto riziko ze statistického hlediska větší a u jiných menší. Dochází k nim zvláště v případě, že identifikované peptidy odpovídající různým proteinům jsou stejné v různých organismech, které se vyskytují ve zkoumaném vzorku. V některých případech pak může jeden peptid získaný po štěpení proteázou (nejčastěji trypsinem) identifikovat různé proteiny. Pravděpodobnost takové falešně pozitivní identifikace se podstatně snižuje, když konkrétní protein identifikují alespoň dva různé peptidy.

Pro ilustraci nesprávného vyhodnocení proteomických dat lze uvést následující případ. V publikaci Bromenshenk et al. [66] se autoři snažili vysvětlit úhyny včel v souvislosti se syndromem zhroucení včelstev (anglicky: colony collapse disorder; CCD) [67] na základě dat z shotgun proteomiky. Ve studii Bromenshenk et al. [66] však byla provedena chybná interpretace proteomických dat [68, 69]. Chyba spočívala ve špatně použité databázi, což vedlo k nespécificky identifikovaným proteinům z Invertebrate Iridescent Virus-6 a mikrosporidie *Nosema*. Proteiny z těchto patogenů byly zjevně nesprávně identifikované namísto identifikace proteinů ze včely medonosné *Apis mellifera*. Proteinové sekvence *A. mellifera* totiž nebyly zahrnuty v původním vyhodnocení, a proto došlo k chybné interpretaci proteomických dat [68, 69]. Souvislost těchto faktorů s CCD byla vyloučena také v jiné publikaci [70]. Z těchto důvodů je velmi důležité dbát při vyhodnocení proteomických dat na eliminaci takovýchto chyb, které lze označit jako falešně pozitivní identifikace. Při vyhodnocení shotgun proteomických dat je tedy v některých případech vhodné ověřovat specifitu MS/MS identifikovaných peptidů proti ostatním organismům individuálně pomocí nástroje Blastp [22, 62]. Kdyby byl tento ověřovací krok učiněn ve studii Bromenshenk et al. [66] pro peptidy identifikující patogeny Iridescent Virus-6 a *Nosema*, byla by jejich nespecificita identifikovaná.

### 6.3. Principiální základ metodiky

Za medu vlastní amylázu lze jednoznačně označit tu, která je produkována dělnicemi včely medonosné. Včelí alfa-amyláza se do medu dostane sekrecí ze žláz dělnic při zpracování živin, které včely posbírají z rostlin a které následně zpracovávají na med [28, 39–41]. Na základě komplexní proteomické analýzy bylo ověřeno, že včelí amyláza medu je identifikovaná pod proteinovými identifikačními čísly BAA86909.1 (nebo identicky NP\_001011598.1) a AAM20738.1 v databázi GenBank. Ačkoliv jsou tyto proteinové sekvence identifikovány po bioinformatickém vyhodnocení jako různé proteinové hity, jedná se *de facto* o stejný protein, který je produktem genu *LOC406114*, jehož alternativní název je také *GB18312*. Výsledky však ukazují, že vyšší intenzita v identifikaci pro sérii analyzovaných vzorků medu byla obecně pro proteinovou sekvenci pod identifikačním označením v GenBank AAM20738.1. Rozdíl je obecně v tom, že alfa-amylázy z různých vzorků včel se zohledněním různých linií nebo poddruhů *A. mellifera* mají malé sekvenční rozdíly. Tyto rozdíly v sekvencích proteinů stejného živočicha jsou však přirozené. V proteomické analýze však mohou snižovat identifikační skóre nebo intenzitu [22, 27].

Z hlediska této metodiky je důležité, do jaké míry jsou sekvence alfa-amyláz taxonomicky spadající k *A. mellifera* a vyskytující se v medu podobné alfa-amylázám z jiných organismů. Toto ilustruje výsledek porovnání proteinové sekvence amylázy *A. mellifera* pomocí nástroje Blastp [71]. Největší sekvenční podobnost s různými amylázami aktuálně vedenými ve veřejné databázi GenBank názorně ukazuje tabulka 1. Právě malý rozdíl mezi první a druhou či třetí proteinovou sekvencí v tabulce 1 způsobí v konečném výsledku jinou pravděpodobnost identifikace proteomickým přístupem. Teoreticky se můžou alfa-amylázy nebo jejich isoformy lišit jednou aminokyselinou nebo několika málo aminokyselinami. Takto malé rozdíly mají potenciální příčinu v genetickém rozdílu mezi poddruhy či liniemi *A. mellifera*. Nutno uvést, že značná podobnost alfa-amylázy *A. mellifera* je také se včelou východní *Apis cerana*, ale i dalšími druhy příbuzných včel, jako je včela obrovská *Apis dorsata* či včela květná *Apis florea*. Poměrně velká podobnost z evolučního hlediska je také s alfa-amylázami různých druhů čmeláků, samotářských včel a také mravenců. Tyto výsledky jsou důležité nejen z metodického, ale také evolučního hlediska. Druhy evropské včely medonosné *A. mellifera* a včely východní *A. cerana* jsou totiž považovány za sesterské druhy, které se měly oddělit někdy před třemi miliony let. Někdy se však uvádí, že k oddělení těchto dvou druhů došlo později, před milionem let [72, 73]. Blízké příbuznosti odpovídá také relativně velmi velká podobnost jejich alfa-amyláz.

Zásadní je míra podobnosti mezi vlastní alfa-amylázy z *A. mellifera* tzv. cizí alfa-amyláze, která bude indikovat svou přítomností falšování medu. Pokud by totiž byla jejich sekvenční podobnost velká, mohlo by existovat riziko falešně pozitivních výsledků identifikace cizí amylázy. V proteomické studii byly identifikovány ve spektru medu celkem tři různé alfa-amylázy, které byly mikrobiálního původu, přičemž všechny identifikované amylázy jsou používány v potravinářství [22]. V předchozím odstavci je uvedena podobnost proteinové sekvence alfa-amylázy *A. mellifera* mezi prvními 50 amylázami v GenBank. Amylázy mikrobiálního původu mezi nimi nenalezneme (tabulka 1), což je velmi dobrý předpoklad pro jejich spolehlivé specifické odlišení proteomickým přístupem.

Dále se podívejme na to, jaká je podobnost mezi „včelí“ alfa-amylázou v medu a alfa-amylázou z *A. niger*, která byla identifikována jako cizí amyláza [22]. Proteinová sekvence alfa-amylázy z *A. niger* (GenBank: XP\_001390778) je velmi podobná jiným sekvencím alfa-amyláz uvedených v GenBank z *Aspergillus* sp. O identifikaci do druhu podle aminokyselinové sekvence

zde může rozhodnout i jediná aminokyselina. K taxonomickému rozlišení do druhů *Aspergillus* sp. není alfa-amyláza tedy úplně vhodným nástrojem. Exaktně je však proteomickým způsobem identifikována cizí alfa-amyláza z *A. niger* nebo jí prakticky identická amyláza. Jako příklad lze uvést alfa-amylázu *A. oryzae*, která je prakticky stejná jako alfa-amyláza *A. niger* a minimální rozdíl je také s *A. flavus*. Malé sekvenční rozdíly mezi amylázami z některých mikroskopických hub názorně ukazuje tabulka 2. Extracelulárních amyláz z mikroskopických hub je využíváno v potravinářství celá řada. K obdobným účelům je však využíváno i řady amyláz z bakterií. Mezi nimi jsou i bakteriální alfa-amylázy z *B. licheniformis* a *B. amyloliquefaciens* [48, 49], které byly ve vzorcích medu také identifikovány jako cizí amylázy [22]. Alfa-amylázy z *B. licheniformis* a *B. amyloliquefaciens* se podstatným způsobem sekvenčně liší nejen od včelí alfa-amylázy, ale i od té z *A. niger*. Vzájemná záměna proteomickým přístupem je prakticky nemožná. Specifita peptidů po trypsinovém štěpení je také dostatečně specifická, což prakticky vylučuje záměnu s jinými proteiny, které se mohou v medu vyskytovat [22].



**Tabulka 1.** Proteinové sekvence nejpodobnější včelí alfa-amyláze, která je v databázi uvedena pod přístupovým číslem AAM20738 (verze AAM20738.1).

Název [taxonomie]	Procento překrytí	Procento identity	Počet AMK	Přístupové číslo (verze) v GenBank
alpha-amylase [ <i>Apis mellifera mellifera</i> ]	100	100	493	AAM20738.1
alpha-amylase precursor [ <i>Apis mellifera</i> ]	100	98,78	493	BAA86909.1/NP_001011598.1
alpha-amylase precursor [ <i>Apis mellifera caucasica</i> ]	100	98,78	493	KAG6800324.1
alpha-amylase 4N [ <i>Apis cerana</i> ]	100	95,33	493	XP_016922158.1
alpha-amylase [ <i>Apis cerana cerana</i> ]	100	95,13	493	PBC31627.1
alpha-amylase 2-like [ <i>Apis dorsata</i> ]	100	94,12	493	XP_006614569.1
alpha-amylase 2-like [ <i>Apis florea</i> ]	100	94,12	493	XP_003694485.1
hypothetical protein E2986_14110 [ <i>Frieseomelitta varia</i> ]	96	78,24	504	KAF3428680.1
alpha-amylase [ <i>Bombus impatiens</i> ]	99	76,22	492	XP_003494475.1
alpha-amylase [ <i>Bombus terrestris</i> ]	99	76,22	492	XP_003400146.1
alpha-amylase-like [ <i>Bombus vancoverensis nearcticus</i> ]	99	76,02	492	XP_033185790.1
alpha-amylase-like [ <i>Bombus vosnesenskii</i> ]	99	75,81	492	XP_033349804.1
PREDICTED: alpha-amylase 1-like [ <i>Eufriesea mexicana</i> ]	96	78,36	492	XP_017752232.1
alpha-amylase 1 [ <i>Eufriesea mexicana</i> ]	96	78,11	544	OAD60265.1
alpha-amylase-like isoform X1 [ <i>Ceratina calcarata</i> ]	95	77,43	494	XP_017880786.1
alpha-amylase-like isoform X2 [ <i>Ceratina calcarata</i> ]	93	77,27	462	XP_026669761.1
PREDICTED: alpha-amylase [ <i>Habropoda laboriosa</i> ]	96	73,07	492	XP_017788498.1
alpha-amylase 4N [ <i>Habropoda laboriosa</i> ]	97	72,71	551	KOC66790.1
alpha-amylase-like [ <i>Osmia bicornis bicornis</i> ]	99	69,17	492	XP_029042576.1
alpha-amylase-like [ <i>Osmia lignaria</i> ]	99	69,57	492	XP_034178282.1
PREDICTED: alpha-amylase-like [ <i>Megachile rotundata</i> ]	100	68,83	492	XP_003704434.2
alpha-amylase [ <i>Ooceraea biroii</i> ]	99	69,31	490	XP_011332012.1
hypothetical protein DMN91_009140 [ <i>Ooceraea biroii</i> ]	99	69,45	489	RLU18783.1
alpha-amylase 4N-like [ <i>Temnothorax curvispinosus</i> ]	99	67,81	493	XP_024874186.1
PREDICTED: alpha-amylase [ <i>Vollenhovia emeryi</i> ]	99	67,34	527	XP_011866200.1
PREDICTED: alpha-amylase 2-like [ <i>Dufourea novaeangliae</i> ]	99	65,99	493	XP_015436969.1
PREDICTED: alpha-amylase [ <i>Acromyrmex echinaior</i> ]	99	66,33	496	XP_011063178.1
alpha-amylase [ <i>Monomorium pharaonis</i> ]	99	66,94	491	XP_012541059.1
alpha-amylase A [ <i>Dufourea novaeangliae</i> ]	99	66,19	540	KZC14162.1
alpha-amylase 2-like [ <i>Nomia melanderi</i> ]	99	65,79	494	XP_031836357.1
alpha-amylase 2-like [ <i>Megalopta genalis</i> ]	99	67,95	494	XP_033323421.1
alpha-amylase 4N-like [ <i>Pseudomyrmex gracilis</i> ]	99	66,67	490	XP_020281589.1
alpha-amylase-like isoform X3 [ <i>Formica exsecta</i> ]	98	67,28	490	XP_029669334.1
alpha-amylase-like isoform X2 [ <i>Formica exsecta</i> ]	98	67,08	490	XP_029669333.1
alpha-amylase [ <i>Camponotus floridanus</i> ]	98	67,42	490	XP_019884420.2
alpha-amylase [ <i>Solenopsis invicta</i> ]	99	66,53	491	XP_025990433.1
PREDICTED: alpha-amylase-like [ <i>Trachymyrmex zeteki</i> ]	99	65,52	496	XP_018303545.1
PREDICTED: alpha-amylase-like [ <i>Trachymyrmex cornetzi</i> ]	99	65,72	496	XP_018363728.1
AM4N amylase [ <i>Acromyrmex charruanus</i> ]	96	66,87	568	KAG5345668.1
AM4N amylase [ <i>Acromyrmex heyeri</i> ]	97	66,53	499	KAG5329743.1
alpha-amylase-like isoform X2 [ <i>Pogonomyrmex barbatus</i> ]	99	66,06	492	XP_011639361.1
AM4N amylase [ <i>Pseudoatta argentina</i> ]	98	65,65	501	KAG5317880.1
PREDICTED: alpha-amylase-like [ <i>Trachymyrmex septentrionalis</i> ]	99	65,31	497	XP_018351449.1
alpha-amylase-like isoform X1 [ <i>Pogonomyrmex barbatus</i> ]	99	66,06	492	XP_011639360.1
alpha-amylase 4N-like [ <i>Nylanderia fulva</i> ]	98	67,15	489	XP_029173184.1
alpha-amylase 1 isoform X1 [ <i>Camponotus floridanus</i> ]	98	66,39	491	XP_011263078.2
PREDICTED: alpha-amylase-like [ <i>Atta colombica</i> ]	95	67,58	496	XP_018049107.1
hypothetical protein [ <i>Vespula germanica</i> ]	95	66,81	489	KAF7396081.1
alpha-amylase [ <i>Pogonomyrmex barbatus</i> ]	99	65,85	492	XP_011639357.1
alpha-amylase 4N [ <i>Trachymyrmex septentrionalis</i> ]	98	64,91	600	KYN45403.1

**Tabulka 2.** Proteinové sekvence nejpodobnější alfa-amyláze z *Aspergillus niger*, která je v databázi uvedena pod přístupovým číslem XP\_001390778 (XP\_001390778.2).

Název [taxonomie]	Procento překrytí	Procento identity	Počet AMK	Přístupové číslo (verze) v GenBank
alpha-amylase A type-1/2 [ <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	100	100	499	XP_001390778.2
alpha-amylase [ <i>Aspergillus awamori</i> ]	100	99,8	499	BAD06002.1
alpha-amylase [ <i>Aspergillus luchuensis</i> ]	99	100	498	BAD01051.1
X-ray structure of a monoclinic form of alpha amylase from <i>Aspergillus</i> at 1.4 Å resolution [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	100	99,8	499	6XSJ_A
RecName: Full=Alpha-amylase A type-3; AltName: Full=1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase; AltName: Full=Taka-amylase A; Short=TAA; Flags: Precursor [ <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40]	100	99,6	499	POC1B4.1
RecName: Full=Alpha-amylase; AltName: Full=1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase; Flags: Precursor [ <i>Aspergillus usamii</i> ]	100	99,8	499	P30292.1
RecName: Full=Alpha-amylase B; AltName: Full=1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase B; Flags: Precursor [ <i>Aspergillus awamori</i> ]	100	99,6	499	Q02906.1
uncharacterized protein G4B84_003854 [ <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	100	99,4	499	XP_041143568.1
Dioscin-alpha-L-rhamnosidase precursor [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	99	99,6	498	ADK23803.1
hypothetical protein G4B11_003916 [ <i>Aspergillus flavus</i> ]	100	99,2	499	QMW40636.1
Taka-amylase A (Taa-G1) precursor [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	100	99,4	499	AAA32708.1
hypothetical protein AFLA_000459 [ <i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357]	99	99,4	498	KAF7618812.1
alpha-amylase [ <i>Aspergillus flavus</i> ]	99	99,2	498	RAQ63995.1
alpha amylase [ <i>Aspergillus flavus</i> ]	100	99	499	APT42868.1
RecName: Full=Alpha-amylase A; AltName: Full=1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase A; Flags: Precursor [ <i>Aspergillus awamori</i> ]	99	99,6	498	Q02905.1
Taka-amylase A precursor [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	100	99,4	499	BAA00336.1
alpha-amylase [ <i>Aspergillus flavus</i> ]	99	99	498	RAQ54155.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus minisclerotigenes</i> ]	99	98,59	498	KAB8273707.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus arachidicola</i> ]	99	98,19	498	KAE8340873.1
alpha-amylase [ <i>Aspergillus arachidicola</i> ]	99	98,19	502	PIG85909.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ]	99	97,99	498	KAB8200363.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus novoparasiticus</i> ]	99	97,79	498	KAB8214608.1
alpha-amylase [ <i>Aspergillus sojae</i> ]	99	97,79	498	BAM28635.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus sergii</i> ]	99	97,59	498	KAE8324966.1
amylase 1 [synthetic construct]	95	99,58	563	AWA80918.1
Orthorhombic crystal structure (space group P21212) of <i>Aspergillus niger</i> alpha-amylase at 1.6 Å resolution [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	95	100	478	2GUY_A
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus tamarii</i> ]	99	94,38	498	KAE8162449.1
alpha-amylase A type-1/2 [ <i>Aspergillus bombycis</i> ]	99	92,57	498	XP_022386797.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus pseudotamarii</i> ]	99	95,18	498	XP_031907825.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus pseudocaelatus</i> ]	99	94,98	498	KAE8411038.1
Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	95	97,91	478	2TAA_A
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus bertholletiae</i> ]	99	93,37	498	KAE8380264.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus pseudonomiae</i> ]	99	92,34	497	KAB8253789.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus pseudonomiae</i> ]	99	92,15	497	XP_031934412.1
alpha-amylase A type-1/2 [ <i>Aspergillus nomiae</i> NRRL 13137]	99	91,97	498	XP_015402287.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus leporis</i> ]	99	84,54	498	KAB8072940.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus alliaceus</i> ]	99	85,28	497	KAE8392003.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus alliaceus</i> ]	99	85,08	497	XP_031906294.1
hypothetical protein ETB97_012704 [ <i>Aspergillus burnettii</i> ]	99	84,91	530	KAF5861684.1
alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus avenaceus</i> ]	99	84,07	495	KAE8144908.1
family 13 alpha amylase in complex with acarbose [ <i>Aspergillus niger</i> ATCC 13496]	84	100	424	RDH13917.1
putative alpha-amylase [ <i>Aspergillus flavus</i> AF70]	84	99,53	424	KOC16238.1
alpha-amylase A type-1/2 [ <i>Aspergillus flavus</i> ]	99	82,13	497	KAB8244571.1
Alpha-amylase A type-3 [ <i>Aspergillus tanneri</i> ]	97	80,41	492	XP_033428176.1
putative alpha-amylase [ <i>Aspergillus lentulus</i> ]	99	79,68	495	GFF98499.1
alpha-amylase A precursor [ <i>Aspergillus terreus</i> ]	99	76,71	497	KAG2415013.1
alpha amylase [ <i>Aspergillus fumigatus</i> var. RP-2014]	99	79,07	494	KEY83532.1
putative alpha-amylase [ <i>Aspergillus udagawae</i> ]	99	78,47	495	GFG19220.1
hypothetical protein ATETN484_0003065900 [ <i>Aspergillus terreus</i> ]	99	76,51	497	GES59433.1
putative alpha-amylase [ <i>Aspergillus udagawae</i> ]	99	78,27	495	GFF98392.1

## **6.4. Metodický postup identifikace cizí amylázy a ověřovací kroky**

Metodický postup, kterým lze identifikovat cizí amylázy vyskytující se v medu, vychází z publikace, ve které byly analyzovány vzorky medu se zaměřením na identifikaci medu vlastním proteinům ze včel, proteinům z rostlin, cizí amylázy, ale také další proteiny původem z hmyzu produkujícího medovici [22]. Specificita spolehlivé identifikace cizích alfa-amyláz v medu bottom-up shotgun proteomickým přístupem s použitím individuálních sekvencí amyláz při vyhodnocení je velká. Stále je však potřeba mít v metodickém postupu ověřovací kroky, které potvrdí správnost identifikace. Předně je potřeba vyloučit kontaminaci medu celým mikroorganismem, který by jako kontaminant v medu mohl cizí amylázu produkovat společně s dalšími proteiny.

### **6.4.1. Správná volba databáze důležitější volby softwaru**

Úspěšnost jednotlivých identifikací a forma prezentace výsledků bude záviset na zvoleném softwaru. V případě prohledání dat z nanoLC-MS/MS v prostředí MaxQuant [74, 75] je vhodné použít v dalším vyhodnocení LFQ intenzity nebo alternativně počet MS/MS identifikací proteinů a peptidů. Oba postupy jsou v zásadě správné a reportované výsledky jsou validní. Velmi důležitá je správná volba databáze pro identifikaci hledaného proteinu, v našem případě suspektní cizí amylázy. To, zda použijeme jiný software než MaxQuant jako např. Mascot [76–78] či třeba Proteome Discoverer [79–81], lze v konečném důsledku považovat za méně podstatné.

### **6.4.2. Volba databáze zaměřená na cizí amylázy**

V principu je metodickým postupem možné identifikovat ve vzorku medu jakoukoliv cizí amylázu, která by v něm byla přítomna. Nemusí se jednat pouze o alfa-amylázu, ale i další formy jako jsou beta- a gama-amyláza. Základní podmínkou však je, že její celá proteinová sekvence nebo sekvence odpovídající peptidům po enzymovém štěpení trypsinem (případně jinou alternativní proteázou) budou součástí databáze pro vyhledávání. Pokud by proteinová sekvence cizí amylázy nebyla v databázi přítomná, je vzhledem k opravdu velkému množství známých sekvencí různých amyláz v databázích velmi vysoká pravděpodobnost také pro identifikaci tzv. způsobem podobnosti. Pro ilustraci je k datu 24. 6. 2021 v GenBank evidováno celkem 975 453 sekvencí pod anglickým klíčovým slovem „amylase“. Menší, ale spolehlivější kurátorovaná a anotovaná databáze, která se nazývá RefSeq (NCBI Reference Sequence Database) [82, 83], pak

zahrnuje 223 557 sekvencí (obrázek 1), a z toho je 195 791 sekvencí bakteriálních a 3 390 sekvencí náleží taxonomicky houbám. Zbýlých 24 376 sekvencí náleží z taxonomického hlediska k jiným organismům. 200 tis. sekvencí je pro vyhodnocení rozsáhlých proteomických dat velký počet a je také možné použít různými způsoby zúženou databázi. Při podezření na konkrétní cizí amylázu je dokonce možné použít konkrétní proteinovou sekvenci, která jí odpovídá. Identifikované peptidy je však vhodné následně ověřit na specifitu proti jiným sekvencím.

The screenshot shows the GenBank RefSeq search results for the query 'amylase'. The search bar at the top contains 'amylase' and a 'Search' button. Below the search bar, there are options for 'Create alert' and 'Advanced'. The left sidebar shows a list of species categories: Animals (8,048), Plants (13,594), Fungi (3,390), Protists (890), Bacteria (195,791), Archaea (1,792), Viruses (52), and Customize ... The main content area displays the search results: 'Items: 1 to 20 of 223557'. There are two informational boxes: one stating 'See amylase pancreatic alpha-amylase-like in the Gene database amylase reference sequences Transcript (1) Protein (1)' and another stating 'See the results of this search (30000 items) in our new Identical Protein Groups database.' The right sidebar shows 'Results by taxon' with a 'Top Organisms [Tree]' section listing various species and their counts: Escherichia coli (4454), Vibrio parahaemolyticus (2280), Streptococcus pneumoniae (1836), Salmonella enterica (1506), Klebsiella pneumoniae (1251), Pseudomonas aeruginosa (1158), Bacillus cereus (1110), Burkholderia ubonensis (1024), unclassified Streptomyces (7792), Streptomyces (15109), and Listeria monocytogenes (858). The bottom of the page shows navigation controls: '<< First < Prev Page 1 of 11178 Next > Last >>' and a note 'Filters activated: RefSeq. Clear all'.

**Obrázek 1.** Počet vyhledaných proteinových sekvencí odpovídající amylázám v GenBank RefSeq k datu 24. 6. 2021.

### 6.4.3. Referenční databáze – mezi vlastní proteiny z *A. mellifera* a proteiny z dalších přirozených zdrojů

Med je produkt včely medonosné. Proteiny, které do něj včelí dělnice dodávají při jeho výrobě jsou nejabundantnějšími proteiny nebo alespoň patří k nejabundantnějším společně s některými rostlinnými proteiny, jejichž nejabundantnější zástupci se podle intenzity objevují v pořadí kolem 20. místa [22]. Proto by zejména proteiny s taxonomickou příslušností k *A. mellifera* měly být součástí prohledávací databáze. Jednou možností je, že použijeme všechny proteinové sekvence odvozené z genomu *A. mellifera* přítomné v aktuálních databázích. Prakticky můžeme podle analýzy genomu očekávat více než 15 tis. genů kódujících proteiny [84, 85]. V GenBank je aktuálně (k 25. 6. 2021) celkově 42 424 sekvencí s příslušností k *A. mellifera* a z toho je 23 504 RefSeq sekvencí. Jako zdroj pro bioinformatické zpracování dat můžeme tedy použít tento docela početný soubor sekvencí.

Spektrum včelích proteinů, které by mělo být v medu obsaženo, musí být nevyhnutelně daleko užší, než činí proteom včelí dělnice. Medu vlastní proteiny původem ze včel by měly být prakticky výhradně ty, které včelí dělnice sekretují do medu při jeho výrobě. Tento fakt podstatným

způsobem eliminuje také počet sekvencí, které postačují pro analýzu proteomu medu. V recentních studiích bylo identifikováno spektrum proteinů tvořící proteom medu a ručně kurátorované sekvence [22, 27] vyústily v seznam 82 proteinových sekvencí. Jedna ze sekvencí v seznamu patří k těm proteinům, které by se v medu za normálních okolností neměly vyskytovat a její pozitivní identifikace by tedy znamenaly zvláštnost ve vzorku medu. Není vyloučeno, že se ve vzorku analyzovaného medu vyskytnou další včelí proteiny. Jejich původ pak může být v nesprávném zpracování medu – např. zahrnutím plodu v rámci při vytáčení medu. I takové možnosti je potřeba brát v úvahu při interpretaci dat [22]. Pro zrychlení a relevantnější vyhodnocení tak s výhodou použijeme při vyhodnocení zúženou a kurátorovanou databázi odpovídající proteomu medu. Další možností je použít pro referenci některý protein z výrazně abundančních včelích proteinů, který by se měl vyskytovat v každém medu. Mezi takový marker patří právě včelí alfa-amyláza (zejména GenBank: BAA86909) [22, 27], kterou lze z pohledu této metodiky považovat za nejvhodnější referenční marker. Další vhodnou možností je úplně nejabundantnější protein v medu, kterým je MRJP1 (GenBank: NP\_001011579) [34]. Protože existuje kurátorovaná databáze čítající 82 sekvencí, je pro skríníng dat shotgun přístupem ideální použít tuto databázi včelích proteinových sekvencí a v dalším vyhodnocení případně využít srovnání intenzity cizí amylázy s intenzitami jiných proteinů, jako je včelí alfa-amyláza.

V medu jsou přítomné také proteiny, které jsou přirozenou součástí živin, které včely přinášejí do úlu a zpracovávají je na med. Jsou jimi zejména rostlinné proteiny z nektaru a pylu, ale také proteiny z medovice. Jejich podíl v medu je odlišný zejména v závislosti na druhu medu. Sekvence odpovídající těmto proteinům můžou být také přidány do prohledávací databáze. Není však jednoduché vybrat databázi obsahující rozumný počet správných sekvencí, aby nedocházelo k negativním vlivům na vyhodnocená data z důvodu příliš velké databáze (statisíce, miliony sekvencí). Právážná většina medů je vícedruhová, a proto může být spektrum potenciálních proteinů z rostlin či medovice velmi variabilní. Je možné použít obdobnou databázi, která je založena na vyselektovaných proteinových skupinách. Prohledávací databáze pak obsahuje přibližně 100 tisíc sekvencí, což je ještě rozumný počet pro vyhodnocení tak komplexních proteomických dat [22]. Pro účel identifikace přítomnosti suspektních cizích amyláz v medu však použití této databáze není nutné. Vystačíme si se sekvencemi suspektních cizích amyláz, které je vhodné doplnit o včelí proteiny.

#### 6.4.4. Ověření správnosti identifikace cizí amylázy – specifita aminokyselin

Pokud bioinformatické vyhodnocení dat potvrdí přítomnost suspektní cizí (alfa-)amylázy, měl by následovat krok, který pro jistotu ověří specifitu její identifikace. Jedním z důležitých parametrů je samotný počet MS/MS identifikovaných peptidů. Čím větší počet peptidů identifikuje cizí amylázu, tím menší je logicky pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku, který by znamenal chybnou interpretaci dat [68, 69]. Velmi riziková z tohoto hlediska je obecně identifikace pouze jedním peptidem. Vzhledem k možnostem řady peptidů vznikajících štěpením alfa-amyláz [22], které mají cca 500 aminokyselin, by byla identifikace pomocí pouze jednoho peptidu bottom-up proteomickým přístupem necílenou analýzou považována za nekvalitní. Na druhou stranu může být z této necílené analýzy získán jeden peptid natolik specifický, že rozliší různé druhy cizích amyláz. Takovýto peptid pak může být využit pro vývoj cílené analýzy.

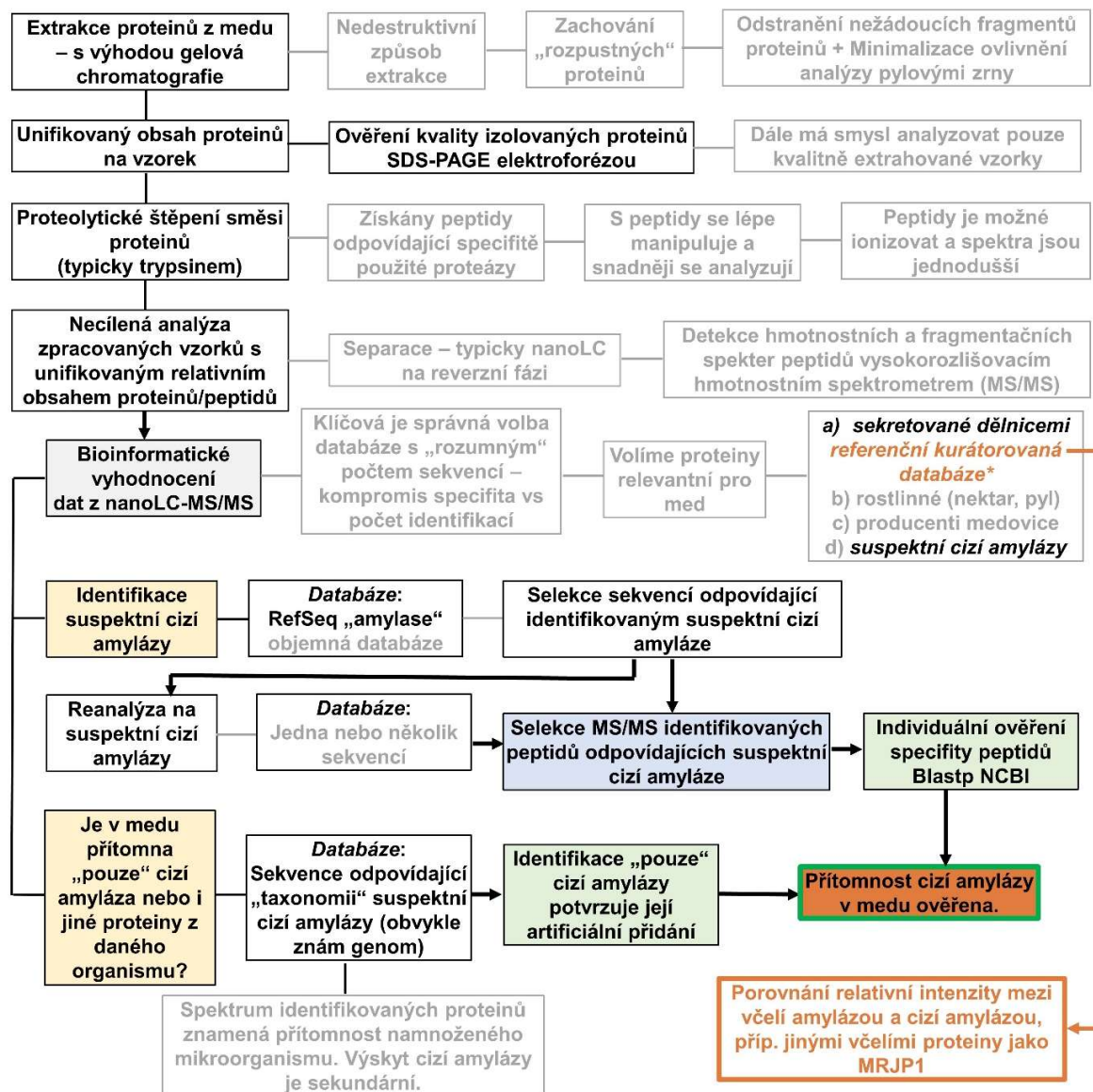
Pro ověření specifity identifikace vyextrahujeme všechny peptidy identifikující cizí alfa-amylázu, které následně podrobíme analýze pomocí nástroje Blastp proti ostatním sekvencím v GenBank nebo jiné zdrojové databázi [22, 62]. Jako příklad dostatečně specifických jednotlivých peptidů lze uvést „EATWLSGYPTDSELYK“ pro *A. niger* (resp. *Aspergillus* sp.), „LQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK“ pro *B. amyloglucofaciens* či „LQNDSAYLAEHGITAVWIPPAYK“ pro *B. licheniformis*. Tyto jednotlivé peptidy vzniklé trypsinovým štěpením sice nejsou úplně specifické pro jeden jediný záznam sekvence alfa-amylázy daného druhu v databázích, ale jejich identifikace s dostatečnou spolehlivostí identifikuje přítomnost suspektní cizí amylázy. Je možné si všimnout zjevné podobnosti uvedených peptidů pro *B. amyloglucofaciens* a *B. licheniformis*, což také odpovídá poměrně blízké taxonomické příbuznosti bakterií, které tuto alfa-amylázu produkují. Zejména je potřeba si v seznamu blastovaných sekvencí všimnout, zda peptid nevykazuje podobnost s proteiny medu vlastními, jako jsou včelí nebo rostlinné proteiny. Každý další MS/MS identifikovaný peptid navíc přispívá ke specifitě a spolehlivosti identifikace. Správnost výsledku dále potvrzuje intenzita identifikovaných peptidů, kterou lze porovnat s intenzitami medu vlastními proteiny.

#### 6.4.5. Ověření, že cizí amylázu neprodukoval do medu mikroorganismus

Když už je ověřena specifita identifikace cizí amylázy, je důležité ověřit, že její přítomnost ve vzorku medu není spojena s přítomností daného mikroorganismu. Mohlo by se totiž teoreticky stát, že by se jednalo o kontaminaci medu celým mikroorganismem [22]. Pro ověření pak použijeme

v dalších prohledání dat dostupné sekvence s příslušnou taxonomií. V případě uvedených třech cizích (alfa-)amyláz z *A. niger*, *B. amyloliquefaciens* i *B. licheniformis* jsou dostupné genomy, což je v podstatě ideální stav. V dnešní době je k dispozici mnoho genomů z mikroorganismů, zvláště těch, jejichž využití je v biotechnologiích. Pokud nejsou ve vzorku medu identifikovány kromě cizí amylázy další proteiny stejné taxonomické příslušnosti, znamená to, že cizí amyláza byla do medu přidána pro kompenzaci nedostatečné diastázové aktivity. Existuje jistá možnost, že by se identifikovaná cizí amyláza dostala do medu společně se sirupem, při jehož výrobě bylo využito enzymové hydrolýzy škrobu amylázou [22]. Odlišení způsobů, jakými se cizí amyláza dostane do medu je možné, ale vyžadovalo by kombinaci s dalšími analytickými postupy.

## 6.5. Schématické znázornění metodiky



**Obrázek 2.** Principiální postup bottom-up shotgun proteomiky pro identifikaci cizí amylázy v medu.

\* Referenční kurátorovaná databáze je reportována v publikaci Erban et al. [22] společně s raw daty na MassIVE pod přístupovým číslem MSV000085697 [86].



## **7. Srovnání novosti metodiky**

Tato metodika jako první svého druhu zahrnuje určení způsobu falšování medu skrze specifickou identifikaci amyláz, které nejsou medu vlastní. Důležitým parametrem kvality medu je diastázová neboli amylázová aktivita. Proto existuje riziko, že by tato enzymová aktivita mohla být nastavena přidáním cizích amyláz. Měření enzymové aktivity neumožňuje exaktní identifikaci cizí amylázy v medu. Pro tento účel je však vhodný metodický postup prezentovaný v této metodice.

Pomocí bottom-up shotgun proteomického přístupu je možné identifikovat prakticky jakoukoliv cizí amylázu v medu. Data mohou být pořízena na různém hardwaru principiálně založeném na LC-MS/MS technologii. Následně může být využito řady vyhodnocovacích softwarů. Metodika se tedy neomezuje na konkrétní vybavení, na kterém byla vyvinuta.

Klíčovým prvkem metodiky je vyhodnocení naměřených dat. Kritické jsou práce s databázemi a zahrnutí ověřovacích kroků, které vyloučí falešně pozitivní identifikace a zároveň poskytnou dostatečně specifickou detekci cizí amylázy. Metodika umožňuje selekci specifických peptidů po štěpení proteázou (nejčastěji trypsinem), které mohou být následně využity pro cílené metody. Cílená metoda přes svoje nesporné výhody v kvantifikaci dokáže identifikovat pouze vybrané analyty, na které je nastavena. Proto je potřeba této metodiky, která umožňuje identifikaci prakticky jakýchkoliv cizích amyláz. Metodika také umožňuje stanovení relativního poměru intenzity cizích amyláz a různých medu vlasních proteinů. Metodický postup s vysvětlujícími komentáři je shrnutý ve schématu na obrázku 2.

## **8. Uplatnění metodiky**

Uplatnění metodiky je v prokazování falšování medu. Metodika má uplatnění na národní i mezinárodní úrovni pro dodržování Codex Alimentarius. Metodika přispěje k dodržování mezinárodně platných kritérií kladených na včelí med. V Česku je potenciálním uživatelem zejména Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), která provádí kontroly medů v Česku.

## **9. Ekonomické zhodnocení metodiky**

Cenové nároky metodického postupu souvisí s použitým hardwarem a také softwarem. Cena za vzorek je tedy potřeba kalkulovat jako rozpětí. Aktuální cenu za kompletní analýzu jednoho

vzorku medu v triplikátu zahrnující přípravu, zpracování, elektroforetický profil, analýzu nanoLC-MS/MS (Orbitrap Fusion) a vyhodnocení dat lze kalkulovat na 7 až 8 tis. Kč bez DPH.

## 10. Publikace, které předcházely metodice

Erban T (2019) Nově o spektru včelích proteinů v medu a o jeho léčivém účinku. Mod včelař 16 (9): 26–27.

Erban T (2020) Sada proteinových markerů pro určení přítomnosti klíčových proteinů ze včel a detekci kontaminace medu cizími amylázami původem z hub druhu *Aspergillus niger* a bakterií *Bacillus amyloliquefaciens* a *Bacillus licheniformis*: užitečný vzor číslo 34171. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha. URL: <https://isdv.upv.cz/doc/FullFiles/UtilityModels/FullDocuments/FDUM0034/uv034171.pdf>

Erban T (2021) MassIVE MSV000085697: proof of honey adulteration by the detection of foreign amylases and quality assessment of honey. Center for Computational Mass Spectrometry, Computer Science and Engineering, University of California, San Diego, CA. DOI: 10.25345/C56N0X. URL: <https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/dataset.jsp?task=c05d7b60e7f9466abb34640711b54552>

Erban T (2021) Nová metoda k potvrzení pravosti medu. Mod včelař 18 (5): 22–23.

Erban T (2021). Nová metoda pro odhalení falšovaného medu. AGRObase zprav 2021 (srpen): 14–15. URL: [http://www.agrocr.cz/data\\_ak/21/a/AGRObase2108.pdf](http://www.agrocr.cz/data_ak/21/a/AGRObase2108.pdf)

Erban T, Shcherbachenko E, Talacko P, Harant K (2019) The unique protein composition of honey revealed by comprehensive proteomic analysis: allergens, venom-like proteins, antibacterial properties, royal jelly proteins, serine proteases, and their inhibitors. J Nat Prod 82: 1217–1226.

Erban T, Shcherbachenko E, Talacko P, Harant K (2021) A single honey proteome dataset for identifying adulteration by foreign amylases and mining various protein markers natural to honey. J Proteomics 239: 104157.

## 11. Seznam literatury

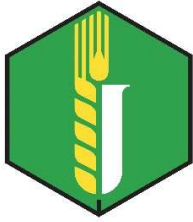
1. Ediriweera ERHSS, Premarathna NYS (2012) Medicinal and cosmetic uses of bee's honey – a review. *Ayu* 33: 178–182.
2. Molan PC (1992) The antibacterial activity of honey 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 5–28.
3. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M (2010) Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr J Nutr Metab* 3: 15–23.
4. Saranraj P, Sivasakthi S, Feliciano GD (2016) Pharmacology of honey: a review. *Adv Biol Res* 10: 271–289.
5. The Lancet (2018) Does a spoonful of honey make the medicine go down? *Lancet* 392: 712–712.
6. Molan PC (2001) Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am J Clin Dermatol* 2: 13–19.
7. Martinotti S, Calabrese G, Ranzato E (2017) Honeydew honey: biological effects on skin cells. *Mol Cell Biochem* 435: 185–192.
8. Ranzato E, Martinotti S (2014) Cellular and molecular mechanisms of honey wound healing. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.
9. Ahmed S, Othman NH (2013) Honey as a potential natural anticancer agent: a review of its mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 829070.
10. Soares S, Amaral JS, Oliveira MBPP, Mafra I (2017) A comprehensive review on the main honey authentication issues: production and origin. *Compr Rev Food Sci Food Safety* 16: 1072–1100.
11. Thrasyvoulou A, Tananaki C, Goras G, Karazafiris E, Dimou M, Liolios V, et al. (2018) Legislation of honey criteria and standards. *J Apic Res* 57: 88–96.
12. Chen C-T, Chen B-Y, Nai Y-S, Chang Y-M, Chen K-H, Chen Y-W (2019) Novel inspection of sugar residue and origin in honey based on the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratio and protein content. *J Food Drug Anal* 27: 175–183.
13. European Commission (EC) (2018) Technical round table on honey authentication: JRC-Geel, Belgium: 25 January 2018: meeting report: ARES(2018)1677606. European Commission, Directorate-General, Joint Research Centre, Directorate F - Health, Consumer & Reference Materials (Geel), Brussels. URL: [https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/ares181569074-1\\_technical\\_round\\_table\\_on\\_honey\\_adulteration\\_report.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/ares181569074-1_technical_round_table_on_honey_adulteration_report.pdf)
14. FAO, WHO (2001) Standard for honey (CODEX STAN 12-1981). adopted in 1981. Revisions 1987 and 2001. In: FAO, WHO (eds) Codex alimentarius: international food standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO). URL: [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS\\_012e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012e.pdf)
15. FAO, WHO (2019) Standard for honey: CXS 12-1981: adopted in 1981. Revised in 1987, 2001. Amended in 2019. In: FAO, WHO (eds) Codex alimentarius: international food standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO). URL: [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS\\_012e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012e.pdf)
16. Rada EU (2002) Směrnice Rady 2001/110/ES ze dne 20. prosince 2001 o medu. Úř věst EU OJ L 10, 12. 1. 2002: 47–52. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32001L0110>

17. Evropský parlament, Rada EU (2014) Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2014/63/EU ze dne 15. května 2014, kterou se mění směrnice Rady 2001/110/ES o medu. Úř věst EU OJ L 164, 3. 6. 2014: 1–5. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=celex:32014L0063>
18. Bogdanov S, Lüllmann C, Martin P, von der Ohe W, Russmann H, Vorwohl G et al. (1999) Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission. *Bee World* 80: 61–69.
19. Persano Oddo L, Baldib E, Accortia M (1990) Diastatic activity in some unifloral honeys. *Apidologie* 21: 17–24.
20. Naila A, Flint SH, Sulaiman AZ, Ajit A, Weeds Z (2018) Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants. *Food Control* 90: 152–165.
21. Voldřich M, Rajchl A, Čížková H, Cuhra P (2009) Detection of foreign enzyme addition into the adulterated honey. *Czech J Food Sci* 27: S280–S282.
22. Erban T, Shcherbachenko E, Talacko P, Harant K (2021) A single honey proteome dataset for identifying adulteration by foreign amylases and mining various protein markers natural to honey. *J Proteomics* 239: 104157.
23. Gallardo JM, Ortea I, Carrera M (2013) Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. *TrAC Trends Anal Chem* 52: 135–141.
24. Ortea I, O'Connor G, Maquet A (2016) Review on proteomics for food authentication. *J Proteomics* 147: 212–225.
25. Danezis GP, Tsagkaris AS, Camin F, Brusica V, Georgiou CA (2016) Food authentication: techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends Anal Chem* 85(A): 123–132.
26. Chua LS, Lee JY, Chan GF (2013) Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405: 3063–3074.
27. Erban T, Shcherbachenko E, Talacko P, Harant K (2019) The unique protein composition of honey revealed by comprehensive proteomic analysis: allergens, venom-like proteins, antibacterial properties, royal jelly proteins, serine proteases, and their inhibitors. *J Nat Prod* 82: 1217–1226
28. Ohashi K, Natori S, Kubo T (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur J Biochem* 265: 127–133.
29. Kubota M, Tsuji M, Nishimoto M, Wongchawalit J, Okuyama M, Mori H, et al. (2004) Localization of alpha-glucosidases I, II, and III in organs of European honeybees, *Apis mellifera* L., and the origin of alpha-glucosidase in honey. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 2346–2352.
30. Li J, Feng M, Zhang Z, Pan Y (2008) Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 39: 199–214.
31. Hu H, Bezabih G, Feng M, Wei Q, Zhang X, Wu F, et al. (2019) In-depth proteome of the hypopharyngeal glands of honeybee workers reveals highly activated protein and energy metabolism in priming the secretion of royal jelly. *Mol Cell Proteomics* 18: 606–621.
32. Kwakman PHS, Zaat SAJ (2012) Antibacterial components of honey. *IUBMB Life* 64: 48–55.
33. Berenbaum MR, Calla B (2021) Honey as a functional food for *Apis mellifera*. *Annu Rev Entomol* 66: 185–208.
34. Won S-R, Lee D-C, Ko SH, Kim J-W, Rhee H-I (2008) Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Res Int* 41: 952–956.
35. Rossano R, Larocca M, Polito T, Perna AM, Padula MC, Martelli G, Riccio P (2012) What are the proteolytic enzymes of honey and what they do tell us? A fingerprint analysis by 2-D zymography of unifloral honeys. *PLoS One* 7: e49164.
36. Di Girolamo F, D'Amato A, Righetti PG (2012) Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *J Proteomics* 75: 3688–3693.

37. Borutinskaitė V, Treigyte G, Matuzevičius D, Zaikova I, Čeksterytė V, Navakauskas D, et al. (2017) Proteomic analysis of pollen and blossom honey from rape seed *Brassica napus* L. *J Apic Sci* 61: 73–92.
38. Borutinskaite V, Treigyte G, Čeksteryte V, Kurtinaitiene B, Navakauskiene R (2018) Proteomic identification and enzymatic activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) honey based on different assays. *J Food Nutr Res* 57: 57–69.
39. Feng M, Fang Y, Li J (2009) Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics* 10: 645.
40. Li J, Feng M, Begna D, Fang Y, Zheng A (2010) Proteome comparison of hypopharyngeal gland development between Italian and royal jelly producing worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *J Proteome Res* 9: 6578–6594.
41. Ahmad S, Khan SA, Khan KA, Li J (2021) Novel insight into the development and function of hypopharyngeal glands in honey bees. *Front Physiol* 11: 615830.
42. Babacan S, Rand AG (2005) Purification of amylase from honey. *J Food Sci* 70: C413–C418.
43. Babacan S, Rand AG (2007) Characterization of honey amylase. *J Food Sci* 72: C050–C055.
44. Babacan S (2001) Honey amylase and the effect in starch-containing foods: doctor of philosophy dissertation. University of Rhode Island, Kingston, RI. URL: <https://digitalcommons.uri.edu/dissertations/AAI3025529>
45. Babacan S, Pivarnik LF, Rand AG (2002) Honey amylase activity and food starch degradation. *J Food Sci* 67: 1625–1630.
46. White, JW, Jr, Riethof ML, Kushnir I (1961) Composition of honey. VI. The effect of storage on carbohydrates, acidity and diastase content. *J Food Sci* 26: 63–71.
47. White, JW, Jr, Kushnir I, Subers MH (1964) Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Food Technol* 18: 153–156.
48. European Commission (2016) Food enzyme applications submitted to the Commission within the legal deadline (from 11 September 2011 to 11 March 2015). Version 4, updated on 25 July 2016. European Commission (EC), Directorate-General for Health and Food Safety (DG SANTE), Brussels. URL: [http://web.archive.org/web/20190718151614/ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/fs\\_food-improvement-agents\\_enzymes-applications.pdf](http://web.archive.org/web/20190718151614/ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/fs_food-improvement-agents_enzymes-applications.pdf)
49. Balakrishnan D, Kumar SS, Sugathan S (2019) Amylases for food applications—updated information. In: Parameswaran, B, Varjani, S, Raveendran, S (eds) *Green bio-processes: enzymes in industrial food processing*. Springer, Singapore, pp 199–227.
50. Catherman AD, Skinner OS, Kelleher NL (2014) Top Down proteomics: facts and perspectives. *Biochem Biophys Res Commun* 445: 683–693.
51. Drabovich AP, Pavlou MP, Batruch I, Diamandis EP (2013) Proteomic and mass spectrometry technologies for biomarker discovery. In: Issaq HJ, Veenstra TD (eds) *Proteomic and metabolomic approaches to biomarker discovery*. Academic Press, Amsterdam, pp 17–37.
52. Northrop JH, Kunitz M (1931) Isolation of protein crystals possessing tryptic activity. *Science* 73: 262–263.
53. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, et al. (2005) Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* 4: 1487–1502.
54. Zhu W, Smith JW, Huang C-M (2010) Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol* 2010: 840518.
55. Hebert AS, Richards AL, Bailey DJ, Ulbrich A, Coughlin EE, Westphall MS, Coon JJ (2014) The one hour yeast proteome. *Mol Cell Proteomics* 13: 339–347.

56. Boudon S, Ounaissi D, Viala D, Monteils V, Picard B, Cassar-Malek I (2020) Label free shotgun proteomics for the identification of protein biomarkers for beef tenderness in muscle and plasma of heifers. *J Proteomics* 217: 103685.
57. Gaspari M, Cuda G (2011) Nano LC–MS/MS: a robust setup for proteomic analysis. In: Toms S, Weil R (eds) *Nanoproteomics: methods and protocols*. Humana Press, New York, NY, pp 115–126.
58. McLafferty FW (2011) A century of progress in molecular mass spectrometry. *Annu Rev Anal Chem* 4: 1–22.
59. Zubarev RA, Makarov A (2013) Orbitrap mass spectrometry. *Anal Chem* 85: 5288–5296.
60. Erban T, Harant K, Chalupnikova J, Kocourek F, Stara J (2017) Beyond the survival and death of the deltamethrin-threatened pollen beetle *Meligethes aeneus*: an in-depth proteomic study employing a transcriptome database. *J Proteomics* 150: 281–289.
61. Kocourek F, Stara J, Sopko B, Talacko P, Harant K, Hovorka T, Erban T (2021) Proteogenomic insight into the basis of the insecticide tolerance/resistance of the pollen beetle *Brassicogethes (Meligethes) aeneus*. *J Proteomics* 233: 104086.
62. Erban T, Harant K, Hubalek M, Vitamvas P, Kamler M, Poltronieri P, et al. (2015) In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Sci Rep* 5: 13907.
63. Erban T, Sopko B, Kadlikova K, Talacko P, Harant K (2019) *Varroa destructor* parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- $\beta$  signaling pathways. *Sci Rep* 9: 9400.
64. Li H, Joh YS, Kim H, Paek E, Lee S-W, Hwang K-B (2016) Evaluating the effect of database inflation in proteogenomic search on sensitive and reliable peptide identification. *BMC Genomics* 17: 1031.
65. Kumar D, Yadav AK, Dash D (2017) Choosing an optimal database for protein identification from tandem mass spectrometry data. In: Keerthikumar S, Mathivanan S (eds) *Proteome bioinformatics*. Humana Press, New York, NY, pp 17–29.
66. Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, et al. (2010) Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* 5: e13181.
67. vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, et al. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4: e6481.
68. Foster LJ (2011) Interpretation of data underlying the link between colony collapse disorder (CCD) and an invertebrate iridescent virus. *Mol Cell Proteomics* 10: M110.006387.
69. Foster LJ (2012) Letter to editor. *Mol Cell Proteomics* 11: A110.006387-006381.
70. Tokarz R, Firth C, Street C, Cox-Foster DL, Lipkin WI (2011) Lack of evidence for an association between Iridovirus and colony collapse disorder. *PLoS One* 6: e21844.
71. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
72. Arias MC, Sheppard WS (1996) Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Mol Phylogenet Evol* 5: 557–566.
73. Arias MC, Sheppard WS (2005) Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 37: 25–35.
74. Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 13: 2513–2526.
75. Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26: 1367–1372.
76. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551–3567.

77. Bouyssié D, Gonzalez de Peredo A, Mouton E, Albigot R, Roussel L, Ortega N, et al. (2007) Mascot file parsing and quantification (MFPaQ), a new software to parse, validate, and quantify proteomics data generated by ICAT and SILAC mass spectrometric analyses: application to the proteomics study of membrane proteins from primary human endothelial cells. *Mol Cell Proteomics* 6: 1621–1637.
78. Brosch M, Yu L, Hubbard T, Choudhary J (2009) Accurate and sensitive peptide identification with Mascot Percolator. *J Proteome Res* 8: 3176–3181.
79. Orsburn BC (2021) Proteome Discoverer—a community enhanced data processing suite for protein informatics. *Proteomes* 9: 15.
80. Gempert DC, Scalf M, Smith LM, Vierstra RD (2016) Morpheus Spectral Counter: a computational tool for label-free quantitative mass spectrometry using the Morpheus search engine. *Proteomics* 16: 920–924.
81. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, et al. (2014) A draft map of the human proteome. *Nature* 509: 575–581.
82. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2007) NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 35: D61–D65.
83. Pruitt KD, Tatusova T, Brown GR, Maglott DR (2012) NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Res* 40: D130–D135.
84. The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931–949.
85. Elsik CG, Worley KC, Bennett AK, Beye M, Camara F, Childers CP, et al. (2014) Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics* 15: 86.
86. Erban T (2021) MassIVE MSV000085697: proof of honey adulteration by the detection of foreign amylases and quality assessment of honey. Center for Computational Mass Spectrometry, Computer Science and Engineering, University of California, San Diego, CA. URL: <https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/dataset.jsp?task=c05d7b60e7f9466abb34640711b54552>



ISBN 978-80-7427-356-8



9 788074 273568 >