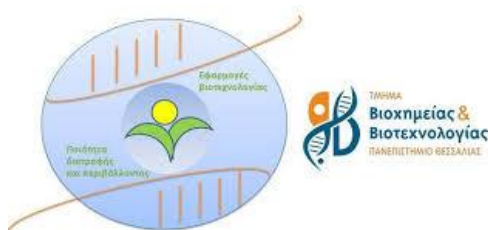




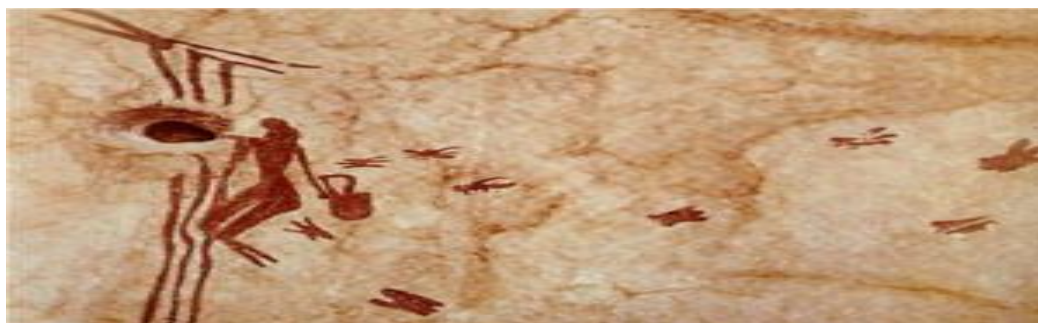
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ &
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

Θέμα Πτυχιακής Εργασίας:

«Η επίδραση της νοθείας του μελιού στην αντιμικροβιακή του δράση»



Γκόβαρη Γλυκερία

Επιβλέπων καθηγητής: Μόσιαλος Δημήτριος (Αναπληρωτής Καθηγητής).

Λάρισα, 2024

Θέμα Πτυχιακής Εργασίας:

« Η επίδραση της νοθείας του μελιού στην αντιμικροβιακή του δράση»

Αγγλικός Τίτλος: « The effect of honey adulteration on its antimicrobial activity »

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- 1. Μόσιαλος Δημήτριος,** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- 2. Αμούτζιας Γρηγόριος,** Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στην Μικροβιολογία του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 3. Πατεράκη Χρυσάνθη,** Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας με έμφαση στην Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον υπεύθυνο καθηγητή της πτυχιακής μου κ. Μόσιαλο Δημήτριο τόσο για τις πολύτιμες συμβουλές του όσο και για την συνεχή καθοδήγηση στην διεξαγωγή του πειράματος αλλά και κατά τη διάρκεια της συγγραφής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο και την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Πατεράκη Χρυσάνθη για το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη της πτυχιακής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την οικογένεια μου για τη στήριξη και τη βοήθεια κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	8
Abstract.....	9
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εισαγωγή – Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας.....	10
1. Μέλι – Μια σύντομη ιστορική αναδρομή.....	10
2. Το μέλι στην επιστημονική έρευνα.....	11
2.1 Η χημική σύσταση του μελιού.....	12
2.1.1 Φυσική υγρασία.....	12
2.1.2 Σάκχαρα.....	14
2.1.3 Πρωτεΐνες.....	15
2.1.4 Ένζυμα.....	16
2.1.5 Αμινοξέα.....	18
2.1.6 Βιταμίνες.....	18
2.1.7 Αρωματικές ενώσεις.....	19
2.1.8 Φαινολικές ενώσεις.....	19
2.1.9 Μικροοργανισμοί και ζύμες.....	20
3. Ταξινόμηση του μελιού - Είδη μελιού.....	20
3.1 Μέλι Βαμβακιού.....	21
3.2 Μέλι ερείκης.....	22
3.3 Θυμαρίσιο μέλι.....	23
3.4 Μέλι καστανιάς.....	24
3.5 Μέλι Manuka.....	25
3.6 Μέλι Πεύκου.....	26
4. Βιολειτουργικά χαρακτηριστικά του μελιού.....	28

4.1 Αντιμικροβιακή δράση.....	28
4.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού.....	34
5. Μέθοδοι νοθείας μελιού.....	
6. <i>Staphylococcus aureus</i> (Χρυσίζων Σταφυλόκοκκος).....	36
7. Σκοπός.....	37
Κεφάλαιο 2^ο : Υλικά και Μέθοδοι.....	38
2.1 Γενικά.....	39
2.1.1 Εργαστηριακά υλικά.....	39
2.1.2 Βακτηριακό στέλεχος.....	39
2.1.3 Θρεπτικά.....	39
2.2 Μέλια.....	40
2.2.1 Τύποι Ελληνικών Μελιών.....	40
2.2.2 Μέλι Manuka.....	40
2.2.3 Τεχνητό Μέλι.....	41
2.3 Μέθοδοι- Πειραματική διαδικασία.....	41
2.3.1 Ανάπτυξη Βακτηριακής Καλλιέργειας.....	41
2.3.2 Μέθοδος Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης- MIC.....	44
2.3.3 Πειραματική διαδικασία για τη μέθοδο Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης- MIC.....	44
2.3.4 Μέθοδος Ελάχιστης Βακτηριοκτόνου Συγκέντρωσης- MBC.....	44
2.3.5 Πειραματική διαδικασία για τη μέθοδο Ελάχιστης Βακτηριοκτόνου Συγκέντρωσης- MBC.....	44
Κεφάλαιο 3^ο : Αποτελέσματα.....	45
3.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης.....	45
3.1.1 Θυμαρίσιο μέλι.....	46
3.1.2 Μέλι Ερείκης.....	47

3.1.3 Μέλι από Βαμβάκι.....	48
3.1.4 Μέλι από Καστανιά.....	49
3.1.5 Πευκόμελο.....	49
3.1.6 Μέλι Manuka.....	50
3.2 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης MBC.....	51
3.2.1 Θυμαρίσιο μέλι.....	52
3.2.2 Μέλι Ερείκης.....	52
3.2.3 Μέλι από Βαμβάκι.....	54
3.2.4 Μέλι από Καστανιά.....	55
3.2.5 Πευκόμελο.....	56
3.2.6 Μέλι Manuka.....	57
Κεφάλαιο 4^ο: Συζήτηση.....	58
4.1 Επίδραση της νοθείας στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού.....	58
Βιβλιογραφία.....	61

Περίληψη

Το μέλι, ήδη από την αρχαιότητα χρησιμοποιούνταν τόσο στην διατροφή των ανθρώπων όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς. Τα τελευταία χρόνια, οι επιστήμονες βασιζόμενοι στο μικροβίωμα του μελιού και στα θρεπτικά του συστατικά έχουν εντείνει την έρευνα γύρω από αυτό. Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούν κυρίως την αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του μελιού. Για το λόγο αυτό, ο σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής ήταν να μελετηθεί σε βάθος για πρώτη φορά πως η νοθεία επηρεάζει μια από τις βασικότερες ιδιότητες που καθιστούν σημαντικό το μέλι, αυτό της αντιβακτηριακής. Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν καθόρισαν την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (MBC) των μελιών χωρίς ή με νοθεία έναντι του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η νοθεία με σουκρόζη επηρέασε σημαντικά τις τιμές MIC και MBC καθιστώντας την νοθεία εύκολα ανιχνεύσιμη μειώνοντας την αντιβακτηριακή δράση των μελιών.

Λέξεις κλειδιά: Μέλι, νοθεία, αντιβακτηριακή δράση, σουκρόζη, ισογλυκόζη, MIC, MBC.

Abstract

Honey has been used since ancient times both in human nutrition and for therapeutic purposes. In recent years, scientists have intensified research on honey based on its microbiome and its nutrients. The research that has been carried out mainly concerns the antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory effects of honey. Therefore, the aim of this thesis was to study in depth for the first time how adulteration affects one of the most important honey biological properties, the antibacterial activity. The bacterium studied was the gram positive, *Staphylococcus aureus*, and both minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values were determined. The results showed that adulteration significantly affected the values of both MIC and MBC, after sucrose adulteration, thus making adulteration easily detectable based on reduced antibacterial activity.

Key words: Honey, adulteration, antibacterial activity, sucrose, isoglucose, MIC, MBC.

Κεφάλαιο 1^ο : Εισαγωγή – Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1.Μέλι – Μια σύντομη ιστορική αναδρομή

Το μέλι είναι μια φυσική γλυκαντική ουσία, η οποία χρησιμοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια από τον άνθρωπο τόσο για διατροφικούς όσο και για θεραπευτικούς λόγους. Ευρήματα κεχριμπαριού στα οποία παγιδεύτηκαν μέλισσες μαρτυρούν ότι αυτές υπάρχουν στη Γη εδώ και 40 έως 50 εκατομμύρια χρόνια. Σε ότι αφορά τη σχέση του ανθρώπου με το μέλι, από στοιχεία που διαθέτουμε μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ακόμη και οι άνθρωποι της Λίθινης Εποχής εκτιμούσαν ιδιαίτερα αυτό το προϊόν των μελισσών (Bogdanov 2015). Ως το πλέον χαρακτηριστικό τεκμήριο μπορούμε να αναφέρουμε αυτό των αναπαραστάσεων ανθρώπων που συλλέγουν μέλι. Πρόκειται για ζωγραφίες σε σπήλαιο που δείχνουν τους λεγόμενους κυνηγούς μελιού. Αυτές δημιουργήθηκαν μεταξύ του 12.000 και 7.000 π.Χ., στη σημερινή ανατολική Ισπανία, κοντά στη Βαλένθια. Η εικόνα δείχνει ένα άτομο που έχει σκαρφαλώσει σε δέντρο και προσπαθεί να μαζέψει μέλι από αποικία μελισσών που ζει σε ένα κοίλωμα δέντρου.

Το γεγονός ότι το μέλι ανέκαθεν ήταν σημαντικό για τον άνθρωπο επιβεβαιώνεται και από τη σημασία του σε λατρευτικές τελετές καθώς και τη μυθοποίησή του σε πολλούς πολιτισμούς. Για παράδειγμα, οι Αιγύπτιοι το θεωρούσαν ήδη το 2.400 π.Χ. τροφή των θεών. Σε αυτή την εποχή ανάγονται εικονογραφικά ευρήματα μελισσοκομίας με κυψέλες σε ναούς και ταφικούς θαλάμους (Crane 1999, Kuropatnicki et al 2018). Υπάρχουν, επίσης, γραπτές μαρτυρίες για την ιδιαίτερη προτίμηση που έδειχναν προς το μέλι Έλληνες και Ρωμαίοι. Ο Ιπποκράτης και ο Αριστοτέλης αναφέρονται στις επιδράσεις του μελιού τόσο στην υγεία όσο και στις αθλητικές επιδόσεις (Kuropatnicki et al 2018).

Στην Κεντρική Ευρώπη ήταν οι γερμανικές φυλές αυτές που ήταν γνωστές για το ενδιαφέρον τους για το μέλι. Το μέλι δεν καταναλωνόταν μόνο σε γιορτές, αλλά χρησίμευε και σε τελετουργικά θυσιών προς τους θεούς. Επίσης, οι Μάγια ήταν ενθουσιώδεις λάτρεις του μελιού. Και γι' αυτούς, το παχύρρευστο προϊόν της μέλισσας είχε τόσο υψηλή αξία που το πρόσφεραν στους θεούς σε

ευχαριστήριες τελετές (Rosale 2013). Η ιστορία του μελιού στην Ευρώπη συνεχίζεται στον Μεσαίωνα. Οι πνευματικοί ηγέτες ήταν υποστηρικτές της μελισσοκομίας, οι βασιλιάδες και οι αυτοκράτορες εκτιμούσαν επίσης το μέλι και τις μέλισσες (Sapozhnik et al 2023).

Στις μέρες μας, και σύμφωνα με οδηγία του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου (Council Directive 2001), το μέλι ορίζεται ως φυσική γλυκιά ουσία που παράγεται από τις μέλισσες με τη λήψη νέктar από φυτά ή εκκρίσεων από φυτοφάγα έντομα σε ζωντανά μέρη των φυτών. Παράγεται κυρίως από τις μέλισσες (*Apis mellifera*). Στην Ελλάδα συναντάμε τέσσερα κοινά είδη της *Apis mellifera* L.: την *A.m. cecropia* στην κεντρική και νότια ηπειρωτική Ελλάδα, την *A.m. carnica* στα Ιόνια νησιά, την *A.m. adami* στην Κρήτη και το νότιο Αιγαίο και την *A.m. macedonica* στη Μακεδονία, τη Θράκη και σε τμήματα της Θεσσαλίας και της Ηπείρου (Xagoraris et al 2021).

2. Το μέλι στην επιστημονική έρευνα

Εισαγωγικά

Το μέλι κατηγοριοποιείται, ανάλογα με τα φυτά από τα οποία προέρχεται, σε μέλι ανθέων και μέλι από μελίτωμα. Μεταξύ των ανθόμελων, τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα είναι πολύφυλλα μέλια, που σημαίνει ότι προέρχονται από διάφορες βοτανικές πηγές, καμία από τις οποίες δεν είναι κυρίαρχη. Ωστόσο, είναι επίσης δυνατόν να βρεθούν μονοφυλλικά μέλια που παρασκευάζονται κυρίως από το νέκταρ ενός είδους λουλουδιού και ονομάζονται ανάλογα με το φυτό αυτό (Celestino Santos-Buelga & Ana M. González-Paramás 2017). Αμιγές θεωρείται το μέλι στο οποίο υπερισχύουν τα οργανοληπτικά, φυσικοχημικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά ενός συγκεκριμένου φυτού και γενικά ταυτίζεται με παρουσία των γυρεοκόκκων του στο μέλι >45% του συνόλου των γυρεοκόκκων. Αυτό το ποσοστό ποικίλλει ανάλογα με το φυτό από το οποίο προέρχεται το μέλι (Louveaux et al 1978, βρέθηκε στο Καραμπουρνή 2008).

2.1. Η χημική σύσταση του μελιού

Η χημική σύσταση του μελιού αφορά την περιεκτικότητα συστατικών όπως υγρασία, μεταλλικά στοιχεία, σάκχαρα, οξέα, ένζυμα, πρωτεΐνες- αμινοξέα, βιταμίνες και πολλά άλλα μικροσυστατικά. Το μέλι είναι ένα υπερκορεσμένο διάλυμα σακχάρων που αντιπροσωπεύουν περίπου το 80% (w/v) της σύνθεσής του, με τη φρουκτόζη (38%) και τη γλυκόζη (31%) να είναι τα δύο πιο άφθονα συστατικά και το νερό είναι το δεύτερο μεγαλύτερο συστατικό του μελιού (Majtan et al, 2021). Η γλυκύτητα και το ιξώδες του μελιού προκύπτουν από την υψηλή περιεκτικότητά του σε υδατάνθρακες (έως και 82%), με το νερό να αντιπροσωπεύει μόνο το 17% της σύνθεσής του- καθώς και βιταμίνες (B2, B3, B5, B6, B9 και C) και ιχνοστοιχεία (K, Ca, P, Mg, Fe, Zn κ.λπ.) (Da Silva et al., 2016; De-Melo et al., 2018). Σε ότι αφορά τη χημική σύνθεση των μελιών, έχουν διαπιστωθεί διαφοροποιήσεις οι οποίες σχετίζονται με τα είδη των ανθέων και των μελιτωμάτων. Αυτό σημαίνει ότι η μέση σύστασή τους ποικίλει ανά περιοχή και σχετίζεται με το εκάστοτε κλίμα και το είδος της χλωρίδας.

Πίνακας 1: Χημική σύνθεση μελιού (Santos-Buelga & González-Paramás, 2017)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	Mean	SD	Range
Νερό	17.90 %	3.16	13.21-26.50 %
Φρουκτόζη	39.44 %	2.11	37.07-42.65
Γλυκόζη	28.15 %	5.74	18.20-32.10
Σουκρόζη	3.19 %	3.81	0.36-16.57
Άλλα σάκχαρα	8.5 %	-	0.1-16.0
Μεταλλικά στοιχεία	0.36 %	0.18	0.11-0.72

Πρωτεΐνες	1.13 %	1.22	0.22-2.93
Οξέα			0.17-1.17
Βιταμίνες, ένζυμα, αρώματα	<0.1 %		
Φαινόλες	0.1 %		0.02-0.2

Πίνακας 2: Μέση σύσταση του ελληνικού μελιού, με βάση 144 δείγματα από μέλια ανθέων και 30 μελιτώματων (Thrasynoulou & Manikis, 1995)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	Μέλι Ανθέων		Μέλι από μελιτώματα	
	Μέση τιμή	Διακύμανση	Μέση τιμή	Διακύμανση
Υγρασία (%)	17,2	14,9-23,0	15,9	13,0-18,9
Φρουκτόζη (%)	38,52	28,0-46,1	28,35	22,2-33,9
Γλυκόζη (%)	31,98	23,4-39,2	22,5	13,4-31,9
Σουκρόζη (%)	3,29	0,0-7,0	3,68	0,01-12,0
Μαλτόζη (%)	-	-	6,24	0,5-11,2
pH	4,0	3,3-5,4	4,9	4,5-5,9
Αγωγιμότητα (mS/cm)	0.64	0,15-2,06	1,33	1,01-1,69
Τέφρα (%)	0,32	0,1-1,2	0,75	0,4-1,1
HMF (mg/Kg)	5,1	0,0-11,9	23,45	0,0-8,2
Διασάση (DU)	22,92	8,6-51,0	452	10,4-37,2

Προλίνη (mg/Kg)	550	264-1205		290-673
-----------------	-----	----------	--	---------

2.1.1 Φυσική υγρασία

Το νέκταρ που μεταφέρεται στην κυψέλη έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό. Το ποσοστό της εξαρτάται βέβαια από τα είδη των ανθέων και τις κλιματολογικές συνθήκες. Στη συνέχεια, και συγκεκριμένα κατά τη διαδικασία ωρίμανσης, παρατηρείται στο μέλι μια σταθερή μείωση της περιεκτικότητας σε νερό. Κατά κανόνα, ένα ώριμο μέλι έχει τιμές κάτω από 18,6% . Κανονιστικά, επιτρέπεται μια περιεκτικότητα σε νερό σε ποσοστό έως 20,0% σε μέλια ανθέων και μελιτωμάτων και έως 23,0% σε μέλι ερείκης (Thrasynoulou et al 2018). Αυτό που είναι σημαντικό, είναι το γεγονός ότι η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Επίσης, το ποσοστό υγρασίας μας δίνει σημαντικές πληροφορίες που σχετίζονται με την ωριμότητά του, τη βοτανική του προέλευση, την ταχύτητα με την οποία θα κρυσταλλώσει, καθώς και την πιθανότητα να υποστεί ζύμωση. Μέλι με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, χαμηλή πυκνότητα και υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, είναι πιο εύκολο να υποστεί ζύμωση, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας και τη συρρίκνωση της διάρκειας ζωής του (Naila et al., 2018). Στην πραγματικότητα, η ενεργότητα του νερού θα πρέπει να θεωρείται αξιόπιστο κριτήριο ελέγχου της ποιότητας του μελιού σε σχέση με την υγρασία, επειδή δείχνει την περιεκτικότητα σε ελεύθερο νερό που τελικά χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για να προκαλέσει ζύμωση (Bogdanov, 2011b).

2.1.2 Σάκχαρα

Τα κύρια συστατικά του μελιού είναι οι υδατάνθρακες (70-80%). Σε αυτούς εμπεριέχονται σάκχαρα, κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα σάκχαρα αποτελούν το 95% των στερεών συστατικών του μελιού και ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθός τους (Naila et al., 2018). Η φρουκτόζη συναντάται σε ποσοστό από περίπου 42%, σε ορισμένα μέλια

unifloral και έως περίπου 32% σε μέλι μελιτώματος (Santos-Buelga & González-Paramás), η δε γλυκόζη σε ποσοστό περίπου 31% . Η φρουκτόζη είναι, γενικά, το κυρίαρχο σάκχαρο στα περισσότερα μέλια, αλλά σε ορισμένα συγκεκριμένα μέλια unifloral, όπως η ελαιοκράμβη (*Brassica napus*) ή η πικραλίδα (*Taraxacum officinale*), η συμβολή της γλυκόζης είναι μεγαλύτερη από εκείνη της φρουκτόζης (ο.π.). Η σύνθεση των σακχάρων μπορεί να επηρεαστεί από τη βοτανική/γεωγραφική προέλευση των μελιών. Έτσι, οι συγκεντρώσεις φρουκτόζης (F) και γλυκόζης (G), εκτός από την αναλογία μεταξύ τους, έχουν προταθεί ως δείκτες για τη διάκριση του μελιτώματος μελιού από τα μέλια νέκταρος (Escuredo et al 2014) Γενικά, τα μελιτώματα έχουν τη χαμηλότερη μέση συγκέντρωση γλυκόζης και φρουκτόζης, αλλά παρουσιάζουν υψηλή αναλογία F/G.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η φρουκτόζη βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο μέλι συγκριτικά με τη γλυκόζη, πλην ελαχίστων εξαιρέσεων. Αυτό συμβαίνει γιατί η γλυκόζη διασπάται από το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης που βρίσκεται στο μέλι. Από τη διάσπαση αυτή προκύπτει ένα μόριο υπεροξειδίου υδρογόνου (H₂O₂) και ένα μόριο γλυκονικού οξέος (Naila et al 2018).

Οι μονοσακχαρίτες αντιπροσωπεύουν περίπου το 75% των σακχάρων που βρίσκονται στο μέλι, μαζί με 10-15% δισακχαρίτες και μικρές ποσότητες άλλων σακχάρων (da Silve et al 2016, Valverde et al 2022). Οι Sanz et al. (2004) ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν 25 διαφορετικά σάκχαρα στα ισπανικά μέλια, συμπεριλαμβανομένων 16 δισακχαριτών και επτά τρισακχαριτών εκτός από τη φρουκτόζη και τη γλυκόζη. Περισσότερα από 45 δι-, τρι- και άλλα ολιγο- και πολυσακχαρίδια έχουν ανιχνευθεί στο μέλι σε μικρές ποσότητες (5-15%) (Lazaridou et al 2004).

2.1.3 Πρωτεΐνες

Ο αριθμός των μελετών σε πρωτεΐνες σε δείγματα μελιού είναι σχετικά χαμηλός, κυρίως λόγω της παρουσίας τους σε μικρές ποσότητες, της δυσκολίας εξαγωγής τους από το πλούσιο σε σάκχαρα περιβάλλον και της πολυπλοκότητας του χαρακτηρισμού τους με συμβατικές προσεγγίσεις (Chua

et al. 2013). Ο Bogdanov (1981) ήταν σε θέση να προσδιορίσει τη μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες από 129 mg / 100g μέλι με διακυμάνσεις περίπου 30 mg / 100g στο μέλι ανθέων πορτοκαλιάς σε πάνω από 400 mg / 100g στο μέλι ερείκης. Η συνολική πρωτεΐνη του μελιού μπορεί να κυμαίνεται από 0,1 έως 0,5%, αν και ορισμένα μέλια (π.χ. ερείκης), έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (1-2%) (Chua, Lee, & Chan, 2013).

Οι πρωτεΐνες του μελιού μπορούν να προέρχονται από το νέктar και τη γύρη των λουλουδιών και περιστασιακά και από το χυμό των φυτών, αλλά συχνότερα προέρχονται από εκκρίσεις αδένων των μελισσών που είναι υπεύθυνες για την ενζυματική διάσπαση της γύρης και του νέκταρ (Αλυσσανδράκης, 2016). Έτσι, το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών εισάγεται στο μέλι από τη μέλισσα (Anklam 1998). Περίπου 20 διαφορετικές μη ενζυμικές πρωτεΐνες έχουν αναγνωρισθεί στο μέλι, πολλές από τις οποίες είναι κοινές σε όλα τα μέλια. Τα νοθευμένα, υπερθερμασμένα ή αποθηκευμένα για μεγάλο χρονικό διάστημα μέλια παρουσιάζουν μείωση ή απουσία περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (Almeida-Muradian et al., 2013).

Μια σημαντική πρωτεΐνη που βρίσκεται στο μέλι είναι η defensin-1. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που αποτελεί μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος των μελισσών και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην προστασία των μελισσών από παθογόνους παράγοντες και λοιμώξεις. Όταν οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ από λουλούδια, η defensin-1 μεταφέρεται στο μέλι, δίνοντάς του αντιμικροβιακές ιδιότητες (Bocian et al, 2019; Hossain et al 2022). Γενικά, οι πρωτεΐνες ασκούν αντιβακτηριακή δράση (Majtan et al 2021).

2.1.4 Ένζυμα

Τα ένζυμα του μελιού προέρχονται από τρεις κύριες πηγές: (α) το νέκταρ και τις εκκρίσεις των φυτών, (β) τις μέλισσες και (γ) τις εκκρίσεις των εντόμων που απορροφούν τα φυτά. Οι βιοχημικές αντιδράσεις μπορούν να χωριστούν σε δύο τύπους: ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιδράσεις. Οι ενζυμικές αντιδράσεις στο μέλι είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την ποιότητα και τις βιολογικές του δραστηριότητες. Τα ένζυμα που υπάρχουν στο μέλι περιλαμβάνουν τη

διασάση, την ιμβερτάση, την οξειδάση της γλυκόζης, την καταλάση, τη γλυκοζυλοκεραμιδάση, την α-αμυλάση, την α-γλυκοσιδάση, την β-γλυκοσιδάση και τις πρωτεάσες (Wed Mohammed Ali 2022 et al 2022).

Η ιμβερτάση διασπά τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Η ιμβερτάση παράγει επίσης σάκχαρα που απαντώνται μόνο στο μέλι. Ένζυμα όπως η ιμβερτάση ή η οξειδάση της γλυκόζης παράγονται κυρίως στους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών (Persano Oddo et al 1999). Αυτά προστίθενται από τις μέλισσες προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία ωρίμανσης του μελιού. Αντίθετα, μερικά ένζυμα προέρχονται από νέκταρ ή γύρη (φυτική προέλευση), όπως η καταλάση και η όξινη 10 φωσφατάση. Τέλος, ένζυμα όπως η διασάση έχουν διπλή προέλευση. Άλλες πιθανές προελεύσεις θα μπορούσαν να είναι οι μικροοργανισμοί του μελιού και στην περίπτωση των μελιτωμάτων, μερικά ένζυμα θα μπορούσαν να προέρχονται από τα φυτά από τα οποία τρέφονται τα έντομα που παράγουν το μελίτωμα.

Το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης μετατρέπει τη γλυκόζη του μελιού με τη βοήθεια οξυγόνου από τον αέρα, απελευθερώνοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου, μία από τις σημαντικές ανασταλτικές ουσίες του μελιού. Η ουσία αυτή έχει αντιβακτηριακή δράση και συμβάλλει στη διατήρηση του μελιού. Το πλούσιο σε ένζυμα μέλι είναι ιδιαίτερα υγιεινό.

Τα ένζυμα είναι θερμοευαίσθητα και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται ως δείκτης γήρανσης και / ή υπερθέρμανσης, καθώς η επίδρασή τους τους μειώνεται σε αυξημένη θερμοκρασία και όξινο περιβάλλον. Μια άλλη περίπτωση αρνητικής επίδρασης στα ένζυμα αφορά αυτή της γρήγορης συλλογής του μελιού. Κι αυτό επειδή οι μέλισσες έχουν περιορισμένο χρόνο για να τα επεξεργαστούν. Εν κατακλείδι, η περιεκτικότητα σε ένζυμα εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την οξύτητα, τη βοτανική προέλευση του μελιού, το ρυθμό μελιτοπαραγωγής και το βαθμό ωρίμανσης (Santos 2017).

Όπως αναφέραμε, η ιμβερτάση είναι το πιο σημαντικό ένζυμο, γιατί μετατρέπει τη σακχαρόζη του νέκταρος σε γλυκόζη και φρουκτόζη, όπως προαναφέρθηκε. Και αυτή επηρεάζεται ή καταστρέφεται από τη θέρμανση και για αυτό το λόγο αξιοποιείται ως δείκτης θερμικής υποβάθμισης του μελιού (Χαριζάνης, 2017; Sánchez et al 2001). Με άλλα λόγια, η δραστηριότητα της χρησιμοποιείται ως

δείκτης φρεσκάδας και τα ελάχιστα όρια για το φρέσκο, μη μεταποιημένο μέλι ρυθμίζονται από διεθνείς και εθνικούς κανονισμούς (Codex Alimentarius 2001; Συμβούλιο ΕΕ 2002).

2.1.5 Αμινοξέα

Το μέλι περιέχει επίσης ελεύθερα αμινοξέα σε επίπεδο περίπου 1% των συστατικών του. Περίπου 26 αμινοξέα έχουν ανιχνευθεί στο μέλι, όπως η προλίνη, το γλουταμινικό οξύ, η αλανίνη, η φαινυλαλαλίνη, η τυροσίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η ιστιδίνη, η αργινίνη, το ασπαρτικό οξύ, η τρυπτοφάνη, η σερίνη, η βαλίνη, η μεθειονίνη, η τρυψίνη και η θρεονίνη, μεταξύ άλλων (Gonzalez-Parama's et al 2006). Η προέλευση των αμινοξέων του μελιού οφείλεται τόσο σε ζωική (εκκρίσεις μελισσών) όσο και σε φυτική προέλευση (νέκταρ, δροσιά μελιού και κυρίως γύρη).

2.1.6 Βιταμίνες

Το μέλι περιέχει μικρές ποσότητες βιταμινών, κυρίως υδατοδιαλυτές. Οι περισσότερες από τις βιταμίνες προέρχονται από τους κόκκους γύρης (Ciulu et al. 2011). Το ασκορβικό οξύ είναι η κυρίαρχη βιταμίνη και βρίσκεται συνήθως σε όλους σχεδόν τους τύπους μελιού. Η μέση περιεκτικότητα έχει υποδειχθεί ότι είναι περίπου 2 mg/100 g (Alvarez-Suarez et al 2010). Η σημαντικότερη βιταμίνη του μελιού είναι η βιταμίνη C, η οποία έχει αντιοξειδωτική δράση. Βιταμίνες του συμπλέγματος Β υπάρχουν επίσης στο μέλι και σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η θειαμίνη (B1), η ριβοφλαβίνη (B2), το νικοτινικό οξύ (B3), το παντοθενικό οξύ (B5), η βιοτίνη (B8) και το φολικό οξύ (B9) (Leo'n-Ruiz et al 2013). Η νιασίνη (B3) 6% και η θειαμίνη (B1) 3%, απαιτούνται για το μεταβολισμό των σακχάρων (Χαριζάνης, 2017)

2.1.7 Αρωματικές ενώσεις

Πτητικές και ημιπτητικές ενώσεις υπάρχουν στα μέλια και είναι υπεύθυνες για τις αρωματικές και γευστικές ιδιότητες. Η γεύση του μελιού παράγεται από πολύπλοκα μείγματα πτητικών ενώσεων, τα οποία μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το νέκταρ ή το μελίτωμα, τη μετατροπή από τις μέλισσες φυτικών συστατικών σε άλλες ενώσεις με πτητικές ιδιότητες, συνθήκες επεξεργασίας, ειδικά θέρμανση και αποθήκευση (da Silva et al. 2016). Οι αλλαγές στο πτητικό κλάσμα που συμβαίνουν στο μέλι κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης έχουν αποδοθεί σε δύο κύριες αιτίες: ενώσεις που είναι ασταθείς και μπορεί να καταστραφούν και πτητικές ενώσεις που παράγονται από μη ενζυματική αμαύρωση (Moreira et al. 2010)

2.1.8 Φαινολικές ενώσεις

Τα φαινολικά φυτοχημικά του μελιού προέρχονται από φυτά, των οποίων το νέκταρ ή το μελίτωμα καταναλώνονται από τις μέλισσες. Περιέχονται σε μέλια σε ένα εύρος περίπου 5-1300 mg / kg (Al-Mamary, Al Meeri, & Al-Habori, 2002). Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες.

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στο μέλι και φαίνεται να συμβάλλουν στην αντιβακτηριακή του δράση. Η αντιβακτηριακή δράση φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών έχει τεκμηριωθεί από τις αρχές του 1990 (Stavropoulou et al 2022). Η ποσότητα του φαινολικού οξέος στο μέλι επηρεάζεται από τη γεωγραφική θέση και τη βοτανική προέλευση του νέκταρ. Επιπλέον, είναι σαφές ότι η περιεκτικότητα σε ολικό φαινολικό οξύ (TP) επηρεάζεται σημαντικά από την εποχή του έτους. Η περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες διαφόρων ποικιλιών μελιού που συλλέχθηκαν μεταξύ Μαΐου και Αυγούστου 2006 παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα οξέων TP (μέσος όρος 170,21 mg/kg) σε σύγκριση με τα ίδια μέλια που συλλέχθηκαν Ιούλιο (μέσος όρος 163,32 mg/kg).

2.1.9 Μικροοργανισμοί και ζύμες

Στο μέλι έχουν βρεθεί διάφοροι μικροοργανισμοί, όπως ζύμες και βακτήρια, όμως υπό φυσιολογικές συνθήκες η ανάπτυξή τους δεν ευνοείται. Αυτό συμβαίνει γιατί το μέλι είναι ένα προϊόν με χαμηλή ενεργότητα νερού λόγω της μεγάλης ποσότητας σακχάρων (φρουκτόζη και γλυκόζη), ενώ επίσης έχει αντιμικροβιακές ενώσεις που προέρχονται από άνθη ή λόγω της διαδικασίας μετατροπής του στην κυψέλη (Silva et al 2017).

Παρά όλους τους φραγμούς μικροοργανισμών μελιού, ορισμένα είδη μικροοργανισμών είναι σε θέση να επιβιώσουν και μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στις μέλισσες ή στους καταναλωτές. Ο κίνδυνος ελλοχεύει όσο τα ποσοστά υγρασίας υπερβαίνουν το 18%. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό ο μελισσοκόμος να αποφεύγει τη συλλογή ανώριμου μελιού, ειδικά από πλαίσια με κελιά που δεν έχουν σφραγιστεί (Bruneau, 2007). Έχει διαπιστωθεί ότι όσο πιο μεγάλο είναι το ποσοστό υγρασίας του μελιού, τόσο μεγαλύτερος είναι και ο αριθμός των σπορίων των ζυμομυκήτων.

Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε την ποικιλομορφία των μολυσματικών μικροοργανισμών στο μέλι, ειδικά λόγω της διάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών στο διεθνές εμπόριο (Silve et al, 2017). Αντίθετα, ευεργετικοί μικροοργανισμοί όπως οι ζύμες μπορούν να παραμείνουν σε λανθάνουσα κατάσταση σε αυτό το προϊόν περιμένοντας τη στιγμή κατά την οποία το περιβάλλον είναι κατάλληλο για την ανάπτυξή τους. Μεταξύ των ευεργετικών βακτηρίων που βρίσκονται στα προϊόντα μελισσών, μπορούμε να αναφέρουμε μερικά βακτήρια γαλακτικού οξέος που δρουν ως προβιοτικά κατά την κατάποση.

3. Ταξινόμηση του μελιού - Είδη μελιού

Εισαγωγικά

Όπως ήδη αναφέραμε, η βάση του μελιού είναι το νέκταρ ή το μελίτωμα, το οποίο συλλέγεται από τη μέλισσα μαζί με τη γύρη από τα φυτά και μεταφέρεται στην κυψέλη με τη μελιτοδόχο κύστη. Η παραγωγή του μελιού αρχίζει στη

μέλισσα και συνεχίζεται στην κυψέλη. Μια συνήθης ταξινόμηση είναι η διάκριση μεταξύ μελιών με νέκταρ και μελιτώματος ανάλογα με τη φυτική τους προέλευση και, πιο συγκεκριμένα, μεταξύ ποικιλιακών και μικτών μελιών ανάλογα με τη συγκομιδή. Τα μέλια από νέκταρ είναι συχνά γλυκά και αρωματικά, έχουν γεύση χαρακτηριστική της αντίστοιχης συγκομιδής και το χρώμα τους μπορεί να κυμαίνεται από σχεδόν λευκό ή ανοιχτό κίτρινο έως σκούρο κίτρινο και καφετί.

Στη συνέχεια θα αναφερθούμε σύντομα σε κάποια χαρακτηριστικά για τη χώρα μας μέλια, καθώς και στο μέλι manuka.

4.2 Μέλι βαμβακιού

Το μέλι βαμβακιού αποτελεί μία από τις αμιγείς κατηγορίες μελιού που παράγει η Ελλάδα σε σημαντικές ποσότητες (Bacandriltsos et al 2018). Έχει χρώμα ανοιχτό μελί και διάφανο που όταν κρυσταλλώσει μέσα σ' ένα διάστημα 1-2 μηνών γίνεται πιο ανοιχτόχρωμο. Η γεύση του είναι χαρακτηριστική και έντονη (Xagoraris et al 2021). Οι Alissandrakis et al. (2005) διαπίστωσαν ότι το μέλι βαμβακιού που παράγεται σε διάφορες τοποθεσίες στην Ελλάδα περιέχει περισσότερα από 35 φαινολικά συστατικά με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και άλλες βιοδραστικές ιδιότητες. Το βαμβακόμελο, λόγω της περιεκτικότητάς του σε σάκχαρα (υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη), κρυσταλλώνεται αρκετά γρήγορα εντός 1-2 μηνών μετά τη συγκομιδή (Sereti et al 2021), αποκτώντας μια μάλλον σκληρή και πολύ χονδροειδή υφή. Για το λόγο αυτό, παρά την υψηλή του βιοδραστικότητα, το μέλι αυτό χρησιμοποιείται συνήθως ως ζωοτροφή των μελισσών και η προώθησή του στην αγορά για ανθρώπινη κατανάλωση καθίσταται αδύνατη, εκτός εάν αναμιχθεί με άλλα είδη μελιού διαφορετικής βοτανικής προέλευσης, τα οποία δεν είναι τόσο επιρρεπή στην κοκκίωση- ωστόσο, η τελευταία επιλογή οδηγεί σε ένα προϊόν μελιού στο οποίο το μέλι βαμβακιού είναι πολύ αραιωμένο.

Λόγω της εκτεταμένης χρήσης φυτοφαρμάκων όμως (Balayannis et al 2008), τα τελευταία χρόνια η παραγωγή του περιορίστηκε σημαντικά. Ένας άλλος

λόγος για τη μικρή παραγωγή βαμβακόμελου είναι και το γεγονός των μικρών αποδόσεων σε νέктar νέων καλλιεργούμενων αυτογόνιμων ποικιλιών βαμβακιού. Γενικά, οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ από τα ανθικά και εξωανθικά νεκτάρια του φυτού του βαμβακιού, καθώς και το μελίτωμα που εκκρίνεται από διάφορα έντομα τα οποία παρασιτούν την καλλιέργεια. Συχνά οι μέλισσες δείχνουν προτίμηση στα εξωανθικά νεκτάρια και στο μελίτωμα το οποίο είναι πλουσιότερο σε σάκχαρα (Tsigouri et al 2004).

Το βαμβακόμελο, σε σχέση με όλα τα άλλα μέλια, έχει την υψηλότερη βακτηριοκτόνο δράση καθώς είναι το πλουσιότερο σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και προσφέρεται για αναμίξεις με βασιλικό πολτό, καλλυντικά, είδη υγιεινής διατροφής κ.λ.π. με την προϋπόθεση να μην έχει ζεσταθεί (Alissandrakis et al.)

3.2. Μέλι ερείκης

Στην Ελλάδα υπάρχουν τέσσερα φυτά της οικογένειας των Ερεικωδών από την νεκταροέκκριση των οποίων παράγονται οι αντίστοιχοι τύποι μελιών. Η *Erica manipuliflora* είναι αυτόχθονη στην Ελλάδα και είναι γνωστή ως «φθινοπωρινή ερείκη», ενώ ο παραδοσιακός όρος που χρησιμοποιείται είναι «σουσούρα». Ωστόσο, το μέλι από *E. manipuliflora* δεν πρέπει να συγχέεται με άλλα μέλια ερείκης που παράγονται κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου, συμπεριλαμβανομένου του *C. vulgaris*, και το μέλι *Erica multiflora* L. Monofloral φθινοπωρινή ερείκη μπορεί να παραχθεί αρκετά εύκολα, καθώς η περίοδος συλλογής του δεν συμπίπτει με την ανθοφορία άλλων μελισσοκομικών φυτών, με εξαίρεση το μέλι *A. unedo*, το οποίο ανθίζει στα τέλη του φθινοπώρου και η περίοδος ανθοφορίας του ακολουθεί εκείνη της *E. Manipuliflora* (Xagoraris et al 2021, βλ. επ. Kasiotis et al 2022). Το ελληνικό φθινοπωρινό μέλι ερείκης είναι γνωστό για το εξαιρετικό αρωματικό του προφίλ, που χαρακτηρίζεται από άρωμα που θυμίζει νότες καραμέλας. Το μέλι αυτό κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα, δηλαδή σε χρονικό διάστημα 1-3 μηνών, εξαιτίας της υψηλής φυσικής περιεκτικότητάς του σε γλυκόζη.

Από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, ξεχωρίζουν οι τιμές υγρασίας που είναι συγκριτικά με άλλες κατηγορίες μελιού υψηλές, μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις υπερβαίνουν το όριο των αγορανομικών διατάξεων (20%).

Το ανοιξιάτικο μέλι ερείκης, σε σύγκριση με το φθινοπωρινό, είναι ανοιχτόχρωμο, έχει διαφορετική γεύση, και χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, η οποία σε πολλές περιπτώσεις κυμαίνεται υψηλότερα από την συγκέντρωση της της φρουκτόζης.

3.3 Θυμαρίσιο μέλι.

Στη κατηγορία αυτή υπάγονται πολλά διαφορετικά είδη. Παράγεται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου, καθώς επίσης και στη Νέα Ζηλανδία και προέρχεται από διαφορετικά είδη θυμαριού (*Thymus*) (Crane et al., 1984). Σύμφωνα με του Persano Oddo & Piro, 2004, το θυμαρίσιο μέλι στην Ελλάδα παράγεται από ποικιλία διαφόρων ειδών του *Thymus* και άλλων του *Labiatae*, ενώ στην Ιταλία προέρχεται από το είδος *Th. Capitatus*. Στην Ισπανία και τη Γαλλία προέρχεται κυρίως από το είδος *Th. Vulgaris* (Karabagias et al 2014, Karabournioti et al 2017).

Το θυμαρίσιο μέλι έχει κεχριμπαρένιο χρώμα και χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση. κρυσταλλώνει σε 6-18 μήνες, ενώ η παραγωγή του ανέρχεται στο 10% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Είναι το διασημότερο ελληνικό μέλι από την αρχαιότητα (βλ. Crane et al., 1984) και λόγω των ιδιαίτερων οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών είναι η σημαντικότερη κατηγορία ελληνικού μελιού. Το θυμάρι ανθίζει το καλοκαίρι και η ροή του νέκταρος εξαρτάται από τον καιρό (δηλαδή το μεσογειακό κλίμα).

Αυτός ο τύπος ελληνικού μελιού παρουσιάζει υψηλότερες τιμές δραστηριότητας διασάτης και προλίνης από άλλα μονοανθικά μέλια, και λόγω των εκτιμώμενων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του, πωλείται σε υψηλότερες τιμές. Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, το θυμαρίσιο μέλι μπορεί να χαρακτηριστεί ως μονόανθο μόνο εάν το ποσοστό γύρης θυμαριού είναι ίσο ή μεγαλύτερο από 18% του συνόλου των κόκκων γύρης νεκταριφόρων και ο συνολικός αριθμός γυρεόκοκκων ανά 10 g μελιού πρέπει επίσης να είναι

μικρότερος από 90.000 (Rodríguez et al 2021). Οι Karabournioti et al (2017) διαπίστωσαν, βάση μιας μελέτης 137 διαφορετικών ειδών θυμαρίσιου μελιού μια μέση τιμή 65.000 γυρεόκοκων ανά 10 g. Μερικές από τις χαρακτηριστικές παραμέτρους για το θυμαρίσιο μέλι είναι τα υψηλά ποσοστά του ενζύμου διαστάσης και προλίνης.

Η γνώση της γεωγραφικής προέλευσης του θυμαρίσιου μελιού είναι αναγκαία και αποτελεί βασική προϋπόθεση για τον προσδιορισμό της ταυτότητας του μελιού, για την τεκμηρίωση της ποιότητάς του, για την ανάδειξη ιδιαίτερων τοπικών χαρακτηριστικών και για την προστασία του καταναλωτή (Nousias et al 2017) .

Σήμερα η Ελλάδα παράγει ετήσια 1.000 τόνους θυμαρίσιο μέλι από το σύνολο των 12.000 περίπου, γεγονός που αντιστοιχεί σε ποσοστό 10%. Το μέλι αυτό θεωρείται και είναι άριστης ποιότητας λόγω του εξαιρετικού αρώματος και της γεύσης του. Αναφέρεται ότι το θυμαρίσιο μέλι είναι τονωτικό, έχει αντισηπτικές ιδιότητες, αυξάνει την ενεργητικότητα και τις φυσικές δυνάμεις του ανθρώπου.

3.4 Μέλι καστανιάς

Το μέλι καστανιάς παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της Καστανιάς (*Castanea sativa* Miller) αλλά και από τις ελιτώδεις εκκρίσεις που προέρχονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola*. Ωστόσο, το καστανόμελο κατατάσσεται στα ανθόμελα με χαρακτηριστικά μελιτώματος, σύμφωνα με νέα οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η βοτανική του προέλευση θα πρέπει να αναφέρεται στη συσκευασία του, είτε διατίθεται αμιγές είτε σε ανάμιξη. Το χρώμα του διαφέρει ανάλογα με τη προέλευσή, από ανοιχτό καφέ μέχρι σκούρο καφέ και μαύρο χρώμα, στην περίπτωση του μελιτώματος. Το μέλι καστανιάς ξεχωρίζει από τα άλλα είδη μελιού στο ότι έχει χαρακτηριστική, επίμονη, πικρή και έντονη γεύση (Θρασυβούλου κ.ά., 2002). Σύμφωνα με τους Drewnowski & Gomez-Carneros (2000) η πικρή γεύση του μελιού καστανιάς δείχνει ότι περιέχει σημαντική ποσότητα πολυφαινολών. Το μέλι καστανιάς δεν κρυσταλλώνεται εύκολα και χρησιμοποιείται ευρέως στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία γαστρίτιδας, παλινδρόμησης, κρυολογήματος, καθώς και άλλων

παθήσεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος.)Taş-Küçükcaydin et al 2023).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη χημική σύσταση του ελληνικού μελιού καστανιάς είναι οι τιμές τέφρας, pH, αναγόντων ζαχάρων και αγωγιμότητας. Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, η αγωγιμότητα του συγκεκριμένου είδους μελιού θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,8 mS.cm⁻¹ (Persano Oddo and Piro, 2004). Το μέλι καστανιάς έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε ζύμες και ανθίσταται περισσότερο στη ζύμωση συγκριτικά από άλλα μέλια. Σχετικές μελέτες που διεξήχθησαν από τους Perna, Simonetti κ.ά. (2013) έδειξαν σαφώς ότι τα μέλια καστανιάς *Casteaneanea Sativa Miller* που παράγονται στη νότια Ιταλία έχουν σχετικές αντιοξειδωτικές κατάλληλες δεσμεύσεις, αν και δεν συσχετίζονται σαφώς με τις συγκεντρώσεις πολυφαινόλων (καθώς και με την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή), σε σύγκριση με άλλες ποικιλίες μελιού, όπως τα πολύχρωμα ή τα εσπεριδοειδή. Διαθέτουν επίσης υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ειδών ελεύθερων ριζών.

3.5 Μέλι manuka

Αυτό το μέλι προέρχεται από το δέντρο ή θάμνο manuka *Leptospermum scoparium*, ένα αειθαλές φυτό της οικογένειας των μυρτιών (Myrtaceae), το οποίο προέρχεται από τη Νέα Ζηλανδία (Alvarez-Suarez et al 2014). Ορισμένα είδη αυτής της οικογένειας, όπως η μανούκα, είναι επίσης γνωστά ως «tea tree» (δέντρο του τσαγιού), καθώς τα φύλλα τους χρησιμοποιήθηκαν από τον καπετάνιο James Cook στο ταξίδι ανακάλυψης της Νέας Ζηλανδίας για την παρασκευή ενός ροφήματος τσαγιού (Carr, 1998). Η μανούκα αναπτύσσεται ως θάμνος ή μικρό δέντρο έως 4 μέτρα, αλλά συνήθως γύρω στα 2 μέτρα ύψος, με σκληρό φλοιό και ελλειπτικά φύλλα ποικίλου μεγέθους. Τα φυτά ανθίζουν από τον Οκτώβριο έως τον Φεβρουάριο με λευκά ή ροζ χρώματος, (Stephens, 2006).

Το παραγόμενο μέλι manuka έχει ανοιχτό έως σκούρο καφέ χρώμα. Η γεύση του μπορεί γενικά να περιγραφεί ως λιγότερο γλυκιά, αρωματικά ξινή έως πικάντικη. Το manuka χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες από τους Μαορί, τους

ιθαγενείς της Νέας Ζηλανδίας, για τις θεραπευτικές του ιδιότητες, π.χ. για εγκαύματα, φλεγμονές ή τραυματισμούς. Διάφορα παρασκευάσματα από το χυμό, τους σπόρους, το φλοιό, τη ρητίνη, τα φύλλα ή τα άνθη του τειόδεντρου διατίθενται για εξωτερική και εσωτερική θεραπεία.

Η παραδοσιακή γνώση για τη χρήση του ως φάρμακο μπορεί να τεκμηριωθεί από επιστημονικές μελέτες. Για παράδειγμα, το μέλι manuka έχει αποδειχθεί ότι έχει υψηλή αντιβακτηριακή δράση (Henriques et al 2010, Patel et al 2013). Ο «μοναδικός παράγοντας manuka» εισήχθη ως μέτρο του αντιβακτηριακού δυναμικού για την ταξινόμηση του μελιού από άποψη βιολειτουργικότητας και έκτοτε χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του «ενεργού» μελιού manuka. Ένα μέλι με UMF 10+ έχει τουλάχιστον την ίδια αντιβακτηριακή δράση με ένα διάλυμα φαινόλης 10% (Roderick et al 1999).

3.6. ΜΕΛΙ ΠΕΥΚΟΥ.

Το μέλι πεύκου προέρχεται από μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica* (Gen (γνωστό ως «βαμβακάδα», «εργάτης», «μικρόβιο» ή «παράσιτο» του πεύκου), το οποίο παρασιτεί στη χαλέπιο (*Pinus halepensis* sub. *halepensis* Miller), και καλύπτει το 65% περίπου της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα (Θρασυβούλου, κ.α., 2002) και στην τραχεία πεύκη (*Pinus halepensis* sub. *brutia* Ten) (Tsavea et al 2022). Οι εκκρίσεις αυτές έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και οι μέλισσες τις συλλέγουν όπως το νέκταρ από τα άνθη. Το μέλι πεύκου που παράγεται την άνοιξη έχει πιο ανοιχτό χρώμα και μεγαλύτερη διαύγεια από αυτό που παράγεται το φθινόπωρο. Δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό, εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη ενώ το άρωμά του είναι πικάντικο και ασυνήθιστο θυμίζοντας αυτό του ιωδίου. Έχει ιδιαίτερο και χαρακτηριστικό χρώμα το οποίο εξαρτάται από την περίοδο παραγωγής του. Κρυσταλλώνει αργά, λόγω της μικρής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, και τα αμιγή πευκόμελα μπορεί να παραμείνουν ρευστά για μεγάλο χρονικό διάστημα το οποίο ξεπερνά τον ενάμιση χρόνο.

Το πευκόμελο είναι ένας μοναδικός τύπος μελιτώματος που παράγεται αποκλειστικά σε χώρες της Ανατολικής Μεσογείου όπως η Ελλάδα και η

Τουρκία. Η ελληνική νομοθεσία εξέδωσε την οδηγία 2001/110/EK του Συμβουλίου σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μελιού. Επιπλέον, στο ΦΕΚ Β-239/23-2-2005 περιγράφονται οι απαιτούμενες ιδιότητες για τις μονοανθικές ελληνικές ποικιλίες μελιού, σύμφωνα με τις οποίες η ηλεκτρική αγωγιμότητα του ελληνικού πευκόμελου πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,9, ενώ και η παρουσία στοιχείων μελιτώματος πρέπει να είναι σημαντική (Tsavea et al, 2022).

Η θρεπτική αξία που έχει το μέλι πεύκου είναι ιδιαίτερα υψηλή χάρη στο μεγάλο αριθμό μετάλλων και ιχνοστοιχείων που περιέχει. Τα ιχνοστοιχεία βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα ελληνικά πευκόμελα χαρακτηρίζοντάς το έτσι ως μέλι με υψηλή θρεπτική αξία (Θρασυβούλου κ.α., 2002) (Μαγνήσιο, ασβέστιο, ψευδάργυρος, σίδηρος και χαλκός είναι κάποια από τα μέταλλα και ιχνοστοιχεία που βρίσκονται στη σύστασή του). Επίσης περιέχει υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, αμινοξέα, βιταμίνες και ένζυμα γεγονός που το κάνει ιδανική τροφή για αθλητές, παιδιά και άτομα με έντονη σωματική και πνευματική δραστηριότητα. Έχει αποδειχθεί πως το μέλι πεύκου έχει αντιφλεγμονώδη και αντισηπτική δράση ενώ βοηθάει και στην αντιμετώπιση του βήχα, του πονόλαιμου και της ουρικής αρθρίτιδας. Επιπλέον έχει τονωτικές ιδιότητες, αυξάνει τον καρδιακό ρυθμό και μειώνει τα προβλήματα που συνδέονται με έλκος ενώ έχει και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Ekicil et al 2014)

Αν και οι αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του πευκόμελου είναι καλά τεκμηριωμένες, λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει μέχρι στιγμής την αντιβακτηριακή του δράση. Η μελέτη των Kafantaris et al (2021), διερεύνησε τις αντιβακτηριακές επιδράσεις του μελιού πεύκου έναντι του *P. Aeruginosa* PA14 σε μοριακό επίπεδο. Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (GO) αποκάλυψε ότι το πευκόμελο επηρέασε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών (BP). Προέκυψε ότι πολλαπλοί μηχανισμοί δράσης εμπλέκονται στην αντιβακτηριακή δράση που ασκείται από το πευκόμελο έναντι του *P. Aeruginosa*.

4. Βιολειτουργικά χαρακτηριστικά του μελιού

4.1 Αντιμικροβιακή δράση

Το μέλι είναι ένα διατροφικό προϊόν που περιέχει βιοδραστικές ενώσεις οι οποίες προέρχονται τόσο από τις μέλισσες όσο και από τα φυτά. Αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις συνδέονται με την αντιμικροβιακή δραστηριότητα του, δηλ. την ικανότητα του να καταστρέφει ή να εμποδίζει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Sagdig et al 2013; Kolayli et al 2016; Morroni et al 2018; Ronsisvalle et al 2019; Stavropoulou et al 2022). Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για τις αυτές τις ιδιότητες των μελιών, ως μια απάντηση στην αύξηση βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά καθώς και στη ζήτηση των καταναλωτών για φαρμακευτικά τρόφιμα (Stavropoulou et al 2022).

Ως αντιβακτηριδιακός παράγοντας, το μέλι διαθέτει βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση, η οποία είναι και η βέλτιστη στα φρέσκα και μη θερμαινόμενα μέλια.. Το μέλι παρουσιάζει ανασταλτική δράση σε περίπου 60 είδη αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων, θετικών και αρνητικών κατά Gram. Ενδεικτικά αναφέρουμε εδώ κάποια από αυτά: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Paenibacillus larvae*, καθώς και ορισμένα *Streptococcus spp*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* και *Pro teus spp* (Molan, 1992a, 1992b).

Το ισχυρό πλεονέκτημα του μελιού είναι ότι δεν έχει παρενέργειες σε σύγκριση με τα συνήθως χορηγούμενα αντιβιοτικά. Ειδικότερα, το μέλι έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αντιφλεγμονώδεις και βακτηριοκτόνες ιδιότητες που μπορεί να είναι χρήσιμες για την πρόληψη και θεραπεία λοιμώξεων καθώς και οξέων και χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών (Stavropoulou et al 2022, Morroni et al 2018).

Η αντιμικροβιακή ισχύς του μελιού θα μπορούσε να αποδοθεί στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του σε συνδυασμό με την παρουσία ορισμένων ενώσεων, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι πολυφαινόλες (Stavropoulou et al 2022, León-Ruiz et al. 2013). Παρ'όλα αυτά, δεν έχουν όλα

τα δείγματα μελιού αντιφλεγμονώδεις ή αντιβακτηριακές ιδιότητες και ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει διευκρινιστεί σαφώς (ο.π.). Η βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνος ικανότητα του μελιού ποικίλλει ανάλογα με τη σύνθεσή του και τον βακτηριακό τύπο κάθε λοίμωξης.

Σύμφωνα με τους Majtan et al 2021), η αντιβακτηριακή δράση μπορεί να διαφέρει από μέλι σε μέλι, αλλά δεν πρέπει να ταυτίζεται με τη δράση της περιεκτικότητας του μελιού σε σάκχαρα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αντιβακτηριακή δραστηριότητα μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από τη θερμική επεξεργασία και τη μακροχρόνια αποθήκευση και επομένως η δραστηριότητα αυτή είναι μια κατάλληλη και ευαίσθητη παράμετρος ποιότητας. Επισημαίνουν, επίσης, ότι τα συστατικά του μελιού που είναι υπεύθυνα για το υψηλό θεραπευτικό/προφυλακτικό δυναμικό του είναι ευαίσθητα στη θερμική επεξεργασία, στην παρατεταμένη αποθήκευση και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη βοτανική πηγή του νέκταρος. Έτσι, δεν παρουσιάζουν όλα τα μέλια (και τα προϊόντα με βάση το μέλι) τις ίδιες, υψηλές ιδιότητες που προάγουν την υγεία.

Πολλοί διαφορετικοί παράγοντες φαίνεται να συμβάλλουν στις αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού:

- **Υψηλή ωσμωτική του ικανότητα.** Η όσμωση προκαλείται ως αποτέλεσμα της υψηλής συγκέντρωσης σακχάρου στο μέλι. Επομένως, το καθαρό, αδιάλυτο μέλι αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων λόγω της περιεκτικότητάς του σε σάκχαρα, η οποία ασκεί οσμωτική πίεση στα βακτηριακά κύτταρα, προκαλώντας ροή νερού από τα βακτηριακά κύτταρα μέσω ώσμωσης. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα συρρικνώνονται λόγω αφυδάτωσης και δεν μπορούν να επιβιώσουν στο υπέρτονο διάλυμα σακχάρου. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η υψηλή οσμωτική πίεση μπορεί να εμποδίσει τον σχηματισμό βιοφίλμ σε βακτήρια όπως το *Pseudomonas aeruginosa* και ο *Staphylococcus aureus* (Majtan et al 2021). Αυτό το αντιβακτηριακό δυναμικό θα είναι χαμηλότερο όταν το μέλι αναμιγνύεται με σωματικά υγρά σε σημεία μόλυνσης (Molan 1992, Saad Almasaudi (2021).

- **Χαμηλή ενεργότητα του νερού.** Στο μέλι, η ενεργότητα του νερού μετρά τα μη δεσμευμένα μόρια νερού και κυμαίνεται από 0,562 έως 0,62, μια συγκέντρωση αρκετά χαμηλή ώστε να επιτρέπει την ανάπτυξη βακτηρίων ή άλλων μικροοργανισμών (Molan 1992, Saad Almasaudi, 2021). Ο συγκεκριμένος φυσικοχημικός συνδυασμός (υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και χαμηλή υγρασία) ευθύνεται για τις χαμηλές τιμές υδατικής δραστηριότητας, που κυμαίνονται από 0,562 έως 0,62 (Majtan et al 2021). Η βακτηριακή ανάπτυξη αναστέλλεται πλήρως σε τιμές που κυμαίνονται από 0,94 έως 0,99, επομένως το μέλι δεν υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών (Albaridi, 2019). Η τοπική εφαρμογή του σε πληγές και τραύματα λόγω ώσμωσης απομακρύνει το υδάτινο στοιχείο και οδηγεί στην αποξήρανση του μολυσμένου ιστού και στη μείωση της βακτηριακής ανάπτυξης.
- **Το χαμηλό pH του μελιού.** Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ουδέτερο pH, που κυμαίνεται από 6,5 έως 7,5. Η οξύτητα του μελιού, μεταξύ pH 3,2 και pH 4,5, είναι ένα πολύ έντονο χαρακτηριστικό της αντιβακτηριακής αποτελεσματικότητάς του. Το χαμηλό pH οφείλεται στην παρουσία αρκετών οργανικών οξέων, όπως γλυκονικό, οξικό, φουμαρικό, γλυοξυλικό, γαλακτικό και γλυκόξινο οξύ (Majtan 2021). Το γλυκογόνο οξύ παράγεται από την οξειδωση της γλυκόζης από ένα ενδογενές ένζυμο οξειδάσης γλυκόζης που είναι ένας εξαιρετικά ισχυρός αντιβακτηριακός παράγοντας. Στο μη αραιωμένο καθαρό μέλι, το χαμηλό pH μπορεί να συμβάλλει στην ισχυρή αντιβακτηριακή του δράση, χωρίς ωστόσο να είναι από μόνο του επαρκές για να αναστείλει την ανάπτυξη πολλών τύπων βακτηρίων όταν αυτά αραιώνονται σε τρόφιμα ή σε άλλα σωματικά υγρά (Molan 1992).]
- **Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)** είναι απολυμαντικό και ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και παρέχει στο μέλι την αντιβακτηριακή του αποτελεσματικότητα και παράγεται ενζυματικά. Η οξειδάση της γλυκόζης, η οποία ενεργοποιείται με την παρουσία νερού, παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο είναι συνήθως ο κύριος αντιβακτηριδιακός παράγοντας του ίδιου του μελιού (Brudzynski, 2020). Επιπλέον, ορισμένα μέλια από συγκεκριμένες πηγές λουλουδιών

περιέχουν διάφορες αντιβακτηριακές ουσίες, όπως η μεθυλογλυοξάλη (MGO) (Mavric et al. 2008).

- **Πρωτεΐνες.** Μελέτες έχουν δείξει ότι σημαντικές πρωτεΐνες βασιλικού πολτού έχουν αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση. Το αντιβακτηριδιακό πεπτιδίο defensin-1 (Def-1) που λαμβάνεται από τις μέλισσες, είναι το κύριο συστατικό που είναι υπεύθυνο για την αντιβακτηριδιακή δράση του μελιού.
- **Πολυφαινολικές ενώσεις.** Οι πολυφαινόλες είναι ομάδες χημικών ουσιών, που χαρακτηρίζονται από τις φαινολικές δομές τους και περιλαμβάνουν φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Αυτές οι βιολογικές ενώσεις μεταφέρονται από το νέκταρ στο μέλι και αποτελούν σημαντικά συστατικά των ιδιοτήτων προώθησης της υγείας του μελιού (Gunes et al. 2017). Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στο μέλι και μπορούν να συμβάλουν στην αντιβακτηριακή του δράση.

Σε ότι αφορά τα αποτελέσματα ερευνών αναφορικά με τα είδη των μελιών που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση, έχουν διαπιστωθεί τα εξής:

- ✚ Εξαιρετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες έχουν εντοπιστεί στο μέλι που παράγεται από τον θάμνο Manuka (*Leptospermum scoparium*) που φύεται στη Νέα Ζηλανδία και την Αυστραλία. Σε αντίθεση με την πλειονότητα των άλλων μελιών νέκταρ και μελιτώματος, ο παράγοντας που ευθύνεται για τη βακτηριοκτόνο δράση αυτού του προϊόντος είναι η υψηλή συγκέντρωση της 1,2-δικαρβονυλικής ένωσης μεθυλογλυοξάλη (MGO).
- ✚ Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού Manuka έχουν συγκριθεί με αυτές άλλων μελιών. Εδώ θα περιοριστούμε σε μια σύντομη ανασκόπηση ερευνών με αντικείμενο μέλια από την Ελλάδα:
 1. Οι Anthimidou & Mossialos (2013), διερεύνησαν την αντιβακτηριακή δράση 31 ελληνικών και κυπριακών μελιών έναντι του *Staphylococcus aureus* και της *Pseudomonas aeruginosa* σε σύγκριση με το μέλι manuka. Όλα τα εξεταζόμενα μέλια επέδειξαν αντιβακτηριακή δράση έναντι του *S. aureus* σε δοκιμασία διάχυσης σε φρεάτιο άγαρ. Η αντιβακτηριακή δράση των μελιών που εξετάστηκαν μπορεί να συνδεθεί σε μεγάλο βαθμό με το σχηματισμό

υπεροξειδίου του υδρογόνου και σε ορισμένες περιπτώσεις σε μη αναγνωρισμένες πρωτεϊνούχες ενώσεις. Τα ελληνικά και κυπριακά μέλια επέδειξαν σημαντική αλλά μεταβλητή αντιβακτηριακή δράση έναντι της *P. aeruginosa* και ιδιαίτερα του *S. aureus*.

2. Σύμφωνα με τους Tanakaki et al (2024), στην Ελλάδα υπάρχουν διάφορα μονοφυή μέλια, τα οποία διακρίνονται για τα μικροσκοπικά, αισθητηριακά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους. Στην έρευνά τους συνέκριναν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα συγκρίθηκε με εκείνη του μελιού Manuka. Προέκυψε ότι τα μελιτώματα έχουν γενικά ισχυρότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό σε σύγκριση με τα ανθόμελα. Επίσης, τα μέλια βελανιδιάς και καστανιάς αναδείχθηκαν ως αυτά με την ισχυρότερη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα μέλια βελανιδιάς εμφάνισαν υψηλότερη συνολική φαινολική περιεκτικότητα σε φαινόλες από το μέλι manuka, το οποίο παρουσίασε επίσης μέτρια-χαμηλή συνολική αντιοξειδωτική δράση, ακολουθώντας αυτή του μελιού ελάτης, πεύκου και ερείκης.
3. Στις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των ελληνικών μελιών εστίασε η έρευνα των Stavropoulou et al (2022). Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες τριών διαφορετικών δειγμάτων μελιού από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας και από διαφορετικές βοτανικές προελεύσεις (κουμαριά, καστανιά και έλατο) και συγκρίθηκαν με το μέλι Manuka. Τα ευρήματα έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα δείγματα ελληνικού μελιού διαθέτουν ξεχωριστές αντιφλεγμονώδεις και αντιβακτηριακές ιδιότητες. Από τη σύγκριση με το μέλι manuka βρέθηκε ότι ο τρόπος δράσης τους ήταν συγκρίσιμος ή πιο ισχυρός από αυτό.
4. Οι Stagos et al (2018) μελέτησαν το αντιβακτηριακό δυναμικό 21 τύπων μελιού που συλλέχθηκαν από τον Όλυμπο έναντι των *S. aureus* και *P. aeruginosa*. Η αντιβακτηριακή δράση έναντι του *S. aureus* και της *P. aeruginosa* παρουσιάστηκε για όλους τους τύπους μελιού που εξετάστηκαν, πιθανώς λόγω των επιπέδων H₂O₂ και της συνολικής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες. Καλύτερη αποτελεσματικότητα της απορρόφησης των ελεύθερων ριζών

παρατηρήθηκε σε αυτούς τους τύπους μελιού σε σύγκριση με το μέλι manuka.

5. Οι Tsavea & Mossialos μελέτησαν την αντιβακτηριακή δράση εννέα μελιών που παράγονται στην περιοχή του Ολύμπου (Ελλάδα) και του manuka έναντι πέντε κύριων νοσοκομειακών και τροφιμογενών παθογόνων. Βρέθηκε ότι ορισμένα μέλια είχαν ασκήσει ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση από το μέλι manuka, το οποίο χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση λοιμώξεων που προκαλούνται από παθογόνα ανθεκτικά σε πολλά φάρμακα. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι μη χαρακτηρισμένες πρωτεϊνούχες ενώσεις αναγνωρίστηκαν ως οι κύριοι αντιβακτηριακοί παράγοντες.
6. Οι Gkoutzouvelidou et al (2021), διερεύνησαν την αντιβακτηριδιακή δράση μελιών από το νησί της Λήμνου συγκριτικά με το μέλι Manuka. Ο *S. aureus* βρέθηκε ευαίσθητος μόνο σε δύο μέλια της Λήμνου και στο manouka. Τα αποτελέσματα ότι όλα τα μέλια της Λήμνου παρουσίασαν αντιβακτηριακή δράση, η οποία, για ορισμένα δείγματα, ήταν παρόμοια με εκείνη του Manuka.
7. Οι Tsavea et al (2023), εξέτασαν την επίδραση 20 δειγμάτων μελιού από τον Όλυμπο σε λοιμογόνους παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεια του *P. Aeruginosa*, σε σύγκριση με το μέλι manuka. Από τα δεδομένα προέκυψε σημαντική αναστολή των λοιμογόνων παραγόντων στα μέλια του Ολύμπου, υπογραμμίζοντας την ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι του *P. aeruginosa*, ενός ανθεκτικού στα αντιβιοτικά παθογόνου αυξανόμενης ανησυχίας, το οποίο εμπλέκεται σε σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις παγκοσμίως.
8. Οι Masoura & Gkatzionis (2022), εξέτασαν στη μελέτη τους την αντιμικροβιακή δράση έξι ελληνικών μελιών, με διαφορετικά ποσοστά κόκκων γύρης θυμαριού και δύο μελιών Manuka. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα θυμαρίσια μέλια είχαν ανώτερη ή ίση αντιμικροβιακή αντοχή σε σύγκριση με αυτό του Manuka, ενώ η θερμική επεξεργασία δεν επηρέασε σημαντικά αυτή τη δραστηριότητα. Η οξύτητα και η υψηλή περιεκτικότητα σε H₂O₂, κοινά χαρακτηριστικά για όλα τα θυμαρίσια μέλια, προκάλεσαν κυτταρική οξειδωτική βλάβη και κυτταρικό θάνατο σε αντίθεση με

τους πληθυσμούς που έλαβαν θεραπεία με Manuka. Η δραστηριότητα του μονοανθικού θυμαρίσιου μελιού (74% γύρη θυμαριού) ήταν υψηλότερη από τα άλλα εγχώρια δείγματα πολυανθικών, γεγονός που επιβεβαιώνει τη φαρμακευτική σημασία αυτού του φαρμακευτικού φυτού.

Κλείνουμε τη σύντομη παρουσίαση ερευνητικών αποτελεσμάτων σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση του μελιού με τις εξής παρατηρήσεις: (α) το μέλι φαίνεται να μας προσφέρει λύσεις στις αυξανόμενες ανάγκες αντιμετώπισης ζητημάτων δημόσιας υγείας, (β) η αποτελεσματικότητα και η ισχύς του μελιού κατά των μικροοργανισμών εξαρτάται από τον τύπο του παραγόμενου μελιού, ο οποίος εξαρτάται από τη βοτανική του προέλευση, την υγεία της μέλισσας, την προέλευσή της και τη μέθοδο επεξεργασίας του (Majtan et al 2021), ωστόσο (β) αν και η αντιμικροβιακή ισχύς των διαφόρων ποικιλιών μελιού εξαρτάται από τη γεωγραφική τους προέλευση και τις διαφορές σύνθεσής τους, ο ακριβής υποκείμενο μηχανισμός παραμένει ακόμα ασαφής, γεγονός που δημιουργεί ανάγκες περαιτέρω έρευνας (Stavropoulou et al 2023).

4.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού

Το μέλι χαρακτηρίζεται επίσης από αντιοξειδωτικό δυναμικό, το οποίο οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις του. Αυτές οι ενώσεις παρουσιάζουν διάφορα προληπτικά αποτελέσματα έναντι διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι φλεγμονώδεις διαταραχές, ο νευρολογικός εκφυλισμός, η επούλωση πληγών, οι μολυσματικές ασθένειες και η γήρανση (Scepankova et al 2017).

Τα μελιτώδη μέλια έχουν γενικά ισχυρότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό σε σύγκριση με τα ανθόμελα, όπως αποδεικνύεται από τη θετική συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Οι Bertonecelj κ.ά. (2007) περιγράφουν μια αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με το χρώμα του μελιού, όπου τα μέλια μελιού με μελίτωμα βρέθηκαν να είναι πιο αντιοξειδωτικά από τα μέλια με άνθη ανοιχτότερου χρώματος. Τα μέλια βελανιδιάς και καστανιάς αναδείχθηκαν μεταξύ των εξεταζόμενων

μονοφυλικών τύπων μελιού ως αυτά με την ισχυρότερη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα μέλια δρυός παρουσίασαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά από το μέλι manuka, το οποίο επίσης παρουσίασε μέτρια-χαμηλή ολική αντιοξειδωτική δράση, ακολουθώντας τα μέλια ελάτης, πεύκου και ερείκης. Εκτός από τις πολυφαινόλες, το μέλι μπορεί να περιέχει και άλλες ουσίες με δυνητικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, π.χ. βιταμίνες (α-τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ) και καροτενοειδή, πεπτιδία, ένζυμα (καταλάση, υπεροξειδάση), οργανικά οξέα και προϊόντα της αντίδρασης Maillard (Bertoncelj et al., 2007). Η αντιοξειδωτική δράση προκύπτει από την αλληλεπίδραση διαφόρων παραγόντων, αλλά οι πολυφαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο μέλι συμβάλλουν σημαντικά. Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και χημικές ιδιότητες (Heim et al., 2002).

5. Μέθοδοι νοθείας μελιού

Η νοθεία του μελιού χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, την άμεση και την έμμεση. Η πρώτη επιτυγχάνεται με την προσθήκη ζάχαρης και την αύξηση περιεκτικότητας του νερού στο μέλι, ενώ η δεύτερη με την υπερτροφή των μελισσών (Jafaar et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα, η νοθεία με ζάχαρη μπορεί να περιλαμβάνει την προσθήκη σιροπιού γλυκόζης (GS), σακχαρόζης (SS) ακόμη και σιροπιού από ρύζι και σιτάρι (Soares et al., 2017). Από την άλλη, η υπερτροφή των μελισσών με τεχνητά σάκχαρα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μελιού στις κηρύθρες.

Ανίχνευση της νοθείας: Η ανίχνευση της νοθείας επιτυγχάνεται με τις παρακάτω μεθόδους

- ❖ Υγρή και αέρια χρωματογραφία
- ❖ Φασματοσκοπία
- ❖ Ανάλυση DNA
- ❖ Μέτρηση RI (για προσδιορισμό περιεκτικότητας του νερού στο μέλι)

6. Staphylococcus aureus (Χρυσίζων Σταφυλόκοκκος)

Ο χρυσίζων *S. aureus* βρίσκεται στο περιβάλλον και βρίσκεται επίσης στη φυσιολογική ανθρώπινη χλωρίδα, που βρίσκεται στο δέρμα και τους βλεννογόνους (συνήθως στη ρινική περιοχή) των περισσότερων υγιών ατόμων. Ο *S. aureus* δεν προκαλεί κανονικά λοίμωξη σε υγιές δέρμα. Ωστόσο, εάν αυτά τα βακτήρια εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος ή στους εσωτερικούς ιστούς, μπορεί να προκαλέσουν μια ποικιλία δυνητικά σοβαρών λοιμώξεων. Η μετάδοση γίνεται συνήθως από άμεση επαφή.

Μπορεί επίσης να επιβιώσει σε οικόσιτα ζώα όπως τα σκυλιά, οι γάτες, τα άλογα. Ο *S. aureus* είναι ένα από τα σημαντικότερα νοσοκομειακά παθογόνα. Πρόκειται για το συνηθέστερο αιτιολογικό παράγοντα της πνευμονίας και το τρίτο κατά σειράν σημαντικότερο αίτιο λοιμώξεων του αίματος. Πολλά στελέχη του είναι ασυνήθιστα επιθετικά και ταυτοχρόνως ανθεκτικά στα κοινά αντιβιοτικά, γεγονός που καθιστά την αντιμετώπιση τους ιδιαίτερα δύσκολη (Ahmad-Mansour 2021, Rao Q et al 2015).

Ο *Staphylococcus aureus* ανακαλύφθηκε στη δεκαετία του 1880. Από τότε, έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα πιθανό παθογόνο Gram-θετικό βακτήριο, προκαλώντας τέτοιες λοιμώξεις όπως μικρές δερματικές λοιμώξεις και μετεγχειρητικές λοιμώξεις τραύματος. Το 1942, δυο χρόνια μετά την εισαγωγή πενικιλίνης για ιατρική χρήση, παρατηρήθηκε σε νοσοκομείο η πρώτη ανθεκτική στην πενικιλίνη απομόνωση *S. aureus*. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 45 ετών, διάφοροι νοσοκομειακοί κλώνοι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη *S. aureus* (HA-MRSA) διαδόθηκαν παγκοσμίως. Επιπλέον, από τη δεκαετία του 1990, λοιμογόνοι κλώνοι MRSA (CA-MRSA) που σχετίζονται με την κοινότητα, εξαπλώθηκαν παγκοσμίως, πρώτα στην κοινότητα, αλλά αργότερα και σε εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης (Ruud et al 2008, Boucher & Corey 2008, Rasigade & Vandenesch 2014).

Το μέλι στην αντιμετώπιση του *S. aureus*

Όπως ήδη αναφέραμε, η αντιμικροβιακή δράση του μελιού προέρχεται από πολλαπλούς παράγοντες, με συνεισφορές από υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, χαμηλή οξύτητα, υπεροξειδίο του

υδρογόνου και φυτοχημικά. Παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση ευρέος φάσματος που εκτείνεται σε περισσότερα από 80 είδη και η αναστολή παθογόνων που μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη τραύματος έχει αποδειχθεί, με στελέχη τόσο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά όσο και ευαίσθητα στα αντιβιοτικά να παρουσιάζουν ευαισθησία στο μέλι (Henriques et al 2010). Ένας σημαντικός αριθμός κλινικών αναφορών έχει καταδείξει και την εξάλειψη του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου (MRSA) με τη χρήση μελιού και ειδικότερα μελιού manuka (Willix et al 1992, Visavadia et al 2008).

7. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της νοθείας στο μέλι και πως αυτή επηρεάζει την αντιμικροβιακή του δράση. Για να επιτευχθεί αυτό εφαρμόστηκαν δυο μέθοδοι, η μέθοδος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης – MIC και η μέθοδος της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης – MBC, τόσο σε ανόθευτα όσο και σε νοθευμένα μέλια με ισογλυκόζη και σουκρόζη.

Κεφάλαιο 2^ο: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Εργαστηριακά υλικά

Αναλώσιμα Υλικά:

- Eppendorf των 1,5 ml και 2 ml
- Tips για μικροπιπέτες διαφόρων μεγεθών
- Αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες
- Κυψελίδες
- Τριβλύα Petri (στρόγγυλα και τετράγωνα)

- Γυάλινα Vials
- Falcon των 50 ml
- Μικροπλάκες 96- θέσεων (96- wells microplates)
- Αποστειρωμένα φίλτρα σύριγγας 0.45 µm Branchia.

Εργαλεία:

- Φλόγιστρο Bunsen
- Μικροβιολογικός κύκλος
- Πιπέτες διαφόρων μεγεθών
- Microplate Replicator

Εργαστηριακά μηχανήματα:

- 96- well plate reader
- Υδατόλουτρο
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Laminar) Bioair Instruments
- Φωτόμετρο Colo LabExperts
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Χύτρα για αποστείρωση
- Vortex
- Κλίβανος επώασης

2.1.2 Βακτηριακό στέλεχος

- *Staphylococcus aureus*

2.1.3 Θρεπτικά

- Mueller Hinton Broth, Biolab Diagnostics Laboratory Inc.
- Nutrient agar Biolab, Biolab Diagnostics Laboratory Inc.

2.2 Μέλια

2.2.1 Τύποι Ελληνικών μελιών

Για τους σκοπούς του πειράματος μελετήθηκαν 5 διαφορετικοί τύποι Ελληνικών μελιών προκειμένου να διαπιστωθεί πως η νοθεία επηρεάζει την αντιμικροβιακή τους δράση. Τα δείγματα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος φυλάσσονταν σε σκιερό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου για την αποφυγή αλλοιώσεων στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Σε κάθε δείγμα μέλι δόθηκε ένας μοναδικός αριθμός αναφοράς. Στον παρακάτω πίνακα κατατίθενται πληροφορίες για τα μέλια.

Πίνακας 1. Δείγματα μελιών που μελετήθηκαν. Δεδομένα που αφορούν την προέλευση, την περιοχή και τον κωδικό αναφοράς.

<u>Κωδικός αναφοράς</u>	<u>Προέλευση</u>	<u>Περιοχή</u>
138	Θυμάρι	Κρουσώνας Ηράκλειο
224	Ερείκη	Σητεία
277	Βαμβάκι	Καρδίτσα
296	Καστανιά	Άγιο Όρος
305	Πεύκο	Θάσος

2.2.2 Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka αποτέλεσε για το πείραμα, δείκτης σύγκρισης όσον αφορά την αντιβακτηριακή ικανότητα σε σχέση με τα δείγματα από τα Ελληνικά μέλια. Το συγκεκριμένο μέλι παράγεται από την εταιρία Manuka Health New Zealand, με UMF 25+ και MGO 550.

2.2.3 Τεχνητό μέλι

Για τους σκοπούς του πειράματος φτιάχτηκε τεχνητό μέλι στο εργαστήριο προκειμένου να επιτευχθεί η νοθεία.

Α) Μέλι με προσθήκη διαλύματος γλυκόζης (της εταιρείας Hoi).

B) Μέλι με προσθήκη διαλύματος σουκρόζης: Σε falcon των 50 ml παρασκευάστηκε τελικό μίγμα περιεκτικότητας 80% v/v σουκρόζης το οποίο αποτελούνταν από 80 gr σουκρόζης (κρυσταλλικής ζάχαρης) διαλυμένα σε 100 ml απιονισμένου νερού. Το τελικό μίγμα με τη βοήθεια σύριγγας μεταφέρθηκε σε vial, στο πάνω μέρος του οποίου είχε τοποθετηθεί φίλτρο διαμέτρου 0.45 μm προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανότητα ύπαρξης κρυσταλλικού κόκκου στο μίγμα.

2.3 Μέθοδοι- Πειραματική διαδικασία

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο πείραμα αφορούσαν:

A) Τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, MIC (Minimum Inhibitory Concentration) για διερεύνηση της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

B) Τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοκτόνος συγκέντρωσης, MBC (Minimum Bactericidal Concentration) για διερεύνηση της αντιβακτηριακής δράσης των μελιών έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

2.3.1 Ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας

Αρχικά είναι απαραίτητη η ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας. Η αρχική καλλιέργεια (glycerol stock) φυλάσσεται σε καταψύκτη στους -80° C. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε σε αποστειρωμένα στρογγυλά τριβλύα τα οποία είχαν επιστρωθεί με θρεπτικό υλικό για το βακτήριο *S.aureus*, Mueller Hinton Broth. Με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου μεταφέρθηκε ποσότητα από το stock στο τριβλύο όπου και αναπτύχθηκαν οι αποικίες του βακτηρίου. Στη συνέχεια, για την απομόνωση και ανάπτυξη μιας αποικίας κάθε φορά, με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας απομονώθηκε μια αποικία και προστέθηκε σε αποστειρωμένο vial με θρεπτικό υλικό. Το vial τοποθετήθηκε σε επωαστήρα

υπό ανάδευση (incubator shaker) για όλη τη νύχτα (overnight) στους 37° C. Τέλος, η βακτηριακή καλλιέργεια αραιώνεται με θρεπτικό διάλυμα (MHB) προκειμένου να επιτευχθεί οπτική πυκνότητα ίση με OD=0,029. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 600 nm.

2.3.2 Μέθοδος ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης- MIC

Οι επιστήμονες που ανέπτυξαν την μέθοδο MIC ήταν οι A.W Downes και L.M Foster το 1919. Πιο συγκεκριμένα, στο πείραμα η μέθοδος MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση μελιού που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί 100% αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*. Η συγκεκριμένη μέθοδος αναπτύχθηκε σε αποστειρωμένες πλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Γερμανία).

2.3.3 Πειραματική διαδικασία για τη μέθοδο Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης – MIC

Αρχικά είναι απαραίτητη η ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας. Η αρχική καλλιέργεια (glycerol stock) φυλάσσεται σε καταψύκτη στους -80° C. Η καλλιέργεια αναπτύχθηκε σε αποστειρωμένα στρογγυλά τριβλύα τα οποία είχαν επιστρωθεί με θρεπτικό υλικό για το βακτήριο *S.aureus*, Mueller Hinton Broth. Με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου μεταφέρθηκε ποσότητα από το stock στο τριβλύο όπου και αναπτύχθηκαν οι αποικίες του βακτηρίου. Στη συνέχεια, για την απομόνωση και ανάπτυξη μιας αποικίας κάθε φορά, με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας απομονώθηκε μια αποικία και προστέθηκε σε αποστειρωμένο vial με θρεπτικό υλικό. Το vial τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) για όλη τη νύχτα (overnight) στους 37° C. Τέλος, η βακτηριακή καλλιέργεια αραιώνεται με θρεπτικό διάλυμα (MHB) προκειμένου να επιτευχθεί οπτική πυκνότητα ίση με OD=0,029. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου στα 600 nm.

Για κάθε ένα από τα 6 μέλια δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (50% v/v, 25% v/v, 12,5% v/v, 6,25% v/v, 3,125% v/v, 1,5% v/v, 0,78% v/v) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης.

Για το ανόθευτο μέλι:

Για κάθε μέλι ξεχωριστά απαιτήθηκαν:

- i. 7 erpendorfs που περιείχαν 800 μL θρεπτικού υλικού (MHB). Στο πρώτο erpendorf που εκφράζει την συγκέντρωση των 50% v/v προστέθηκε ποσότητα μελιού 800 μL . Στην συνέχεια πραγματοποιούνταν διαδοχικές αραιώσεις με μεταφορά ποσότητας τελικού όγκου 800 μL από το πρώτο erpendorf μέχρι το τελευταίο στο οποίο βρίσκονταν η αραιώση ίση με συγκέντρωση 0,78% v/v.
- ii. Από την 96 θέσεων well microplate, 7 πηγαδάκια εις τριπλούν, στο οποίο από τα καθένα προστέθηκε:
 - a. 190 μL από την κάθε αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση μελιού.
 - b. 10 μL αραιωμένης βακτηριακής καλλιέργειας.
- iii. Για κάθε εξεταζόμενο μέλι προστίθονταν ως control το μέλι Manuka
 - a. 190 μL από την κάθε αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση μελιού.
 - b. 10 μL αραιωμένης βακτηριακής καλλιέργειας.
- iv. Θετικό control. Μια τριπλέτα που περιείχε
 - a. 190 μL θρεπτικού υλικού.
 - b. 10 μL αραιωμένης βακτηριακής καλλιέργειας.
- v. Αρνητικό control. Μια τριπλέτα που περιείχε
 - a. 200 μL θρεπτικού υλικού.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) του microplate για χρόνο $t=0$ στο μηχάνημα *Absorbance Microplate Reader* στα 600 nm. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software*. Έπειτα το microplate τοποθετήθηκε σε επωαστήρα για 24 ώρες και ακολουθήθηκε μέτρηση για $t=24$ με τον ίδιο τρόπο.

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης , στην οποία δεν υπήρξε βακτηριακή ανάπτυξη υπολογίζεται βάση τα παρακάτω: Η OD για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για t=24 μείον τη μέτρηση για t=0. (δηλ. $OD_{testwell} = T24\ test - T0\ test$ και $OD_{of\ corresponding\ control\ well} = T24_{control} - T0_{control}$)

Ως MIC προσδιορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση μελιού που οδηγεί σε 100% αναστολή της ανάπτυξης. Το ποσοστό της αναστολής της ανάπτυξης για το κάθε μέλι στο κάθε πηγαδάκι στην κάθε αραιώση προσδιορίστηκε με βάση τον τύπο: **$100\% \text{ΑΝΑΣΤΟΛΗ} = 1 - (OD_{testwell} / OD_{of\ corresponding\ control\ well}) \times 100$** (Patton et al., 2006).

Για το νοθευμένο μέλι από ισογλυκόζη:

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν όμοια με αυτή για το ανόθευτο μέλι με εξαίρεση το πρώτο (i) στάδιο. Πιο συγκεκριμένα, το κάθε μέλι νοθεύτηκε για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις νοθείας από ισογλυκόζη, 10%, 20%, 30% και 40%. Στην αρχή για κάθε ποσοστό νοθείας προστέθηκε σε falcon των 50 mL ανάλογη ποσότητα μελιού και ισογλυκόζης. Για την 40% v/v νοθεία προστέθηκαν 6 mL μελιού και 4mL ισογλυκόζης , για την 30% v/v 7 mL μελιού και 3 mL ισογλυκόζης κ.ο.κ. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε ανάδευση μέσω vortex για την ομογενοποίηση του μίγματος και μεταφορά του στα erpendorfs. Η συγκεκριμένη τεχνική έφερε δυσκολίες καθώς το μίγμα δεν ομογενοποιούνταν και δεν μπορούσε να μεταφερθεί η σωστή ποσότητα στα erpendorfs. Για αυτό το λόγο, προστέθηκε αρχικά για το κάθε ποσοστό νοθείας , ανάλογη ποσότητα ισογλυκόζης, μελιού και θρεπτικού σε Erpendorf που αντιστοιχούσε στο 50% v/v , πραγματοποιήθηκε ανάδευση μέσω vortex και ακολουθήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις. Τα υπόλοιπα βήματα πραγματοποιήθηκαν όπως και στο ανόθευτο μέλι.

Για το νοθευμένο μέλι από σουκρόζη:

Η διαδικασία ήταν η ίδια που πραγματοποιήθηκε και με το νοθευμένο μέλι από ισογλυκόζη. Ειδικότερα, προτιμήθηκε για τεχνικούς λόγους, η προσθήκη διαλύματος σουκρόζης να γίνει απευθείας για κάθε ποσοστό νοθείας στα errendorfs προκειμένου να επιτευχθεί η ακριβής νοθεία. Έτσι, για το ποσοστό 40% της νοθείας προστέθηκαν 400 μL σουκρόζης, 600 μL μελιού και 1000 μL θρεπτικό κ.ο.κ. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα ποσοστά νοθείας με τις σωστές αναλογίες.

2.3.4 Μέθοδος Ελάχιστης Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωσης- MBC

Ως ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται από οποιονδήποτε αντιβακτηριακό παράγοντα προκειμένου να σκοτώσει εξ' ολοκλήρου τον υπό εξεταζόμενο βακτήριο (Szweda., 2017).

2.3.5 Πειραματική διαδικασία για τη μέθοδο Ελάχιστης Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωσης- MBC

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν όμοια τόσο για την ανόθευτη μορφή του μελιού όσο και για την νοθευμένη από ισογλυκόζη και σουκρόζη. Για την μέτρηση MBC ήταν απαραίτητη η επίστρωση τετράγωνων τριβλύων με θρεπτικό Mueller Hinton Agar. Στη συνέχεια, εφόσον έχει πραγματοποιηθεί η μέτρηση MIC, μεταφέρεται μικρή ποσότητα από τα πηγαδάκια του microplate στο επιστρωμένο τριβλύο με τη βοήθεια ενός εργαλείου, του microplate Replicator. Το replicator πριν τη χρήση του αποστειρώθηκε μέσω φλόγιστρου για την αποφυγή ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών πέρα του *S.aureus*. Έπειτα, το microplate τοποθετήθηκε σε κλίβανο για επώαση στους 37 ° C για 24 ώρες. Τέλος, MBC προσδιορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση μελιού στην οποία δεν υπήρξε καθόλου ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας.

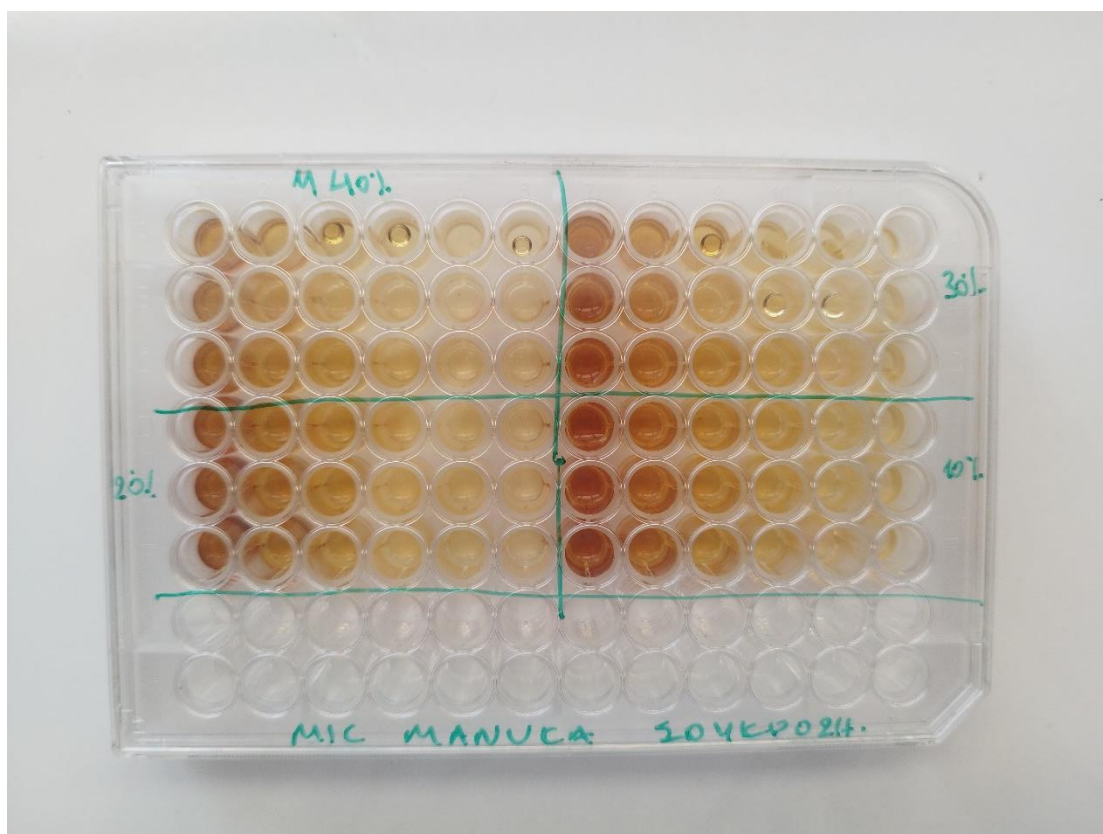


Εικόνα 1. Microplate Replicator για την μέτρηση MBC.

Κεφάλαιο 3^ο: Αποτελέσματα

3.1 Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC (Minimum Inhibitory Concentration) με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν την ελάχιστη συγκέντρωση μελιών που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί η αναστολή του παθογόνου βακτηρίου *S.aureus*. Το κάθε μέλι μελετήθηκε τόσο στην ανόθευτη μορφή του, όσο και σε κατάσταση νοθείας , ύστερα από προσθήκη: α) διαλύματος ισογλυκόζης και β) διαλύματος σουκρόζης, σε ποσοστά 40%, 30%, 20% και 10%. Όλα τα μέλια εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις των 50% v/v, 25% v/v, 12,5% v/v, 6,25% v/v, 3,125% v/v και 1,5% v/v. Τέλος, για κάθε plate μελιού υπήρχε προσθήκη μελιού Manuka καθώς και θετικό (+) και αρνητικό (-) control.



Εικόνα 1.2 Microtiter plate με διαδοχικές αραιώσεις συγκεντρώσεων για την μέτρηση MIC (Minimum Inhibitory Concentration) στο μέλι MANUKA έναντι του παθογόνου *Staphylococcus aureus*.

3.1.1 Θυμαρίσιο μέλι

Το θυμαρίσιο μέλι παρουσιάζει στην ανόθευτη μορφή του MIC= 25% v/v. Όπως φαίνεται η MIC παραμένει σταθερή και για τις 4 συγκεντρώσεις στην νοθεία με ισογλυκόζη, ενώ για την νοθεία με σουκρόζη παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές για τα ποσοστά 40% και 30% κατά τα οποία η MIC ανέρχεται στο 50% , ενώ φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται στο 10% και 20%.

Πίνακας 1. MIC (minimum inhibitory concentration) για θυμαρίσιο μέλι έναντι του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

MIC-ΘΥΜΑΡΙΣΙΟΥ ΜΕΛΙΟΥ		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
MIC= 25%v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC = 25% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC = 25% v/v
-	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 25% v/v

3.1.2 Μέλι Ερείκης

Το ανόθευτο μέλι Ερείκης έχει MIC= 25%v/v. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πειράματος, η νοθεία από ισογλυκόζη δεν επηρεάζει σε κανένα ποσοστό της την MIC του μελιού, σε αντίθεση με την νοθεία από σουκρόζη που παρουσιάζει σημαντικές διαφορές για νοθεία σε ποσοστά 20%, 30% και 40%, η οποία ανέρχεται από 25% v/v σε 50%v/v.

Πίνακας 2. MIC (minimum inhibitory concentration) για μέλι Ερείκης έναντι του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

MIC- ΜΕΛΙ ΕΡΕΙΚΗΣ		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>

MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 25% v/v

3.1.3 Μέλι από Βαμβάκι

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για το μέλι από βαμβάκι είναι 25% v/v. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η MIC επηρεάζεται από τη νοθεία με ισογλυκόζη για ποσοστά της τάξης 40% και 30% , κατά τα οποία η MIC είναι 50% v/v. Από την άλλη, η νοθεία με σουκρόζη φαίνεται να επηρεάζει την MIC του μελιού σε όλα τα ποσοστά νοθείας που εφαρμόστηκαν.

Πίνακας 3. MIC (minimum inhibitory concentration) για μέλι έναντι του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

<u>MIC- ΜΕΛΙ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ</u>		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC= 50% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 50% v/v	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 50% v/v

3.1.4 Μέλι καστανιάς

Το ανόθευτο MIC για μέλι καστανιάς είναι 25% v/v. Η ανασταλτική του ικανότητα επηρεάζεται τόσο με τη νοθεία από ισογλυκόζη όσο και από τη νοθεία με σουκρόζη. Πιο συγκεκριμένα, η MIC στην νοθεία ισογλυκόζης αυξάνεται στο 50% v/v για 20%, 30% και 40% νοθεία, ενώ όσον αφορά την σουκρόζη παρατηρείται αύξηση της MIC για 30% και 40% νοθεία.

Πίνακας 4. MIC (minimum inhibitory concentration) για μέλι έναντι του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

<u>MIC- ΜΕΛΙ</u>		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>40%</u>, MIC= 50% v/v	Νοθεία: <u>40%</u>, MIC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>30%</u>, MIC= 50% v/v	Νοθεία: <u>30%</u>, MIC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>20%</u>, MIC= 50% v/v	Νοθεία: <u>20%</u>, MIC= 25% v/v
	Νοθεία: <u>10%</u>, MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>10%</u>, MIC= 25% v/v

3.1.5 Πευκόμελο

Το πευκόμελο εμφανίζει ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση 25% v/v για την ανόθευτη μορφή του. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές κυρίως για τη νοθεία με σουκρόζη, όπου παρουσιάζεται αύξηση της MIC στο 50% v/v σε όλες τις συγκεντρώσεις νοθείας αλλά και για τη νοθεία με ισογλυκόζη που επηρεάζεται η MIC στο 40% της νοθείας, ενώ στα υπόλοιπα ποσοστά παραμένει στο 25% v/v.

Πίνακας 5. MIC (minimum inhibitory concentration) για το πευκόμελο έναντι του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

<u>MIC- ΠΕΥΚΟΜΕΛΟ</u>		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ</u> <u>ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ</u> <u>ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC= 50% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC= 50% v/v
-	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 25% v/v	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 50% v/v

3.1.6 Μέλι Manuka

Το ανόθευτο μέλι manuka έχει την μικρότερη MIC, 6,25% v/v. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές για το 30% και 40% τόσο για τη νοθεία με ισογλυκόζη όσο και για τη νοθεία με σουκρόζη, με την MIC να ανέρχεται από 6,25% v/v σε 12,5 % v/v.

Πίνακας 6. MIC (minimum inhibitory concentration) για το μέλι Manuka έναντι του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

<u>MIC- ΜΕΛΙ MANUKA</u>

<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
MIC= 6,25% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC= 12,5% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MIC= 12,5% v/v
-	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 12,5% v/v	Νοθεία: <u>30%</u> , MIC= 12,5% v/v,
-	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC= 6,25% v/v	Νοθεία: <u>20%</u> , MIC= 6,25% v/v
-	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 6,25% v/v	Νοθεία: <u>10%</u> , MIC= 6,25% v/v

3.2 Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) Minimum Bactericidal Concentration

Τα μέλια που εξετάστηκαν για MIC στη συνέχεια ελέγχθηκαν και για ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (MBC). Πιο συγκεκριμένα, μικρή ποσότητα από κάθε πηγαδάκι μεταφέρθηκε με την βοήθεια του micro replicator σε τριβλύο με θρεπτικό υλικό για το βακτήριο *S. aureus*. Στις συγκεντρώσεις που δεν αναπτύχθηκε αποικία θεωρείται ότι υπάρχει MBC. Όλα τα μέλια ελέγχθηκαν τόσο στην ανόθευτη όσο και στην νοθευμένη κατάσταση τους και για συγκεντρώσεις των 50% v/v, 25% v/v, 12,5% v/v, 6,25% v/v, 3,125% v/v και 1,5% v/v.

3.2.1 Μέλι από θυμάρι

Η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται από το θυμαρίσιο μέλι για να θανατωθεί το βακτήριο *S.aureus* στην ανόθευτη μορφή του είναι 25% v/v. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η ποσότητα του μελιού πρέπει να διπλασιαστεί (50% v/v) προκειμένου να επιτευχθεί αυτό όσον αφορά την νοθεία

με ισογλυκόζη και σουκρόζη για τα υψηλά ποσοστά της , 30% και 40%. Αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι τα μικρά ποσοστά νοθείας δεν επηρέασαν την βακτηριοκτόνο δράση του μελιού.

Πίνακας 7. MBC (minimum bactericidal concentration) του μελιού από θυμάρι έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

<u>MBC- ΜΕΛΙ ΑΠΟ ΘΥΜΑΡΙ</u>		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
<u>MBC= 25% v/v</u>	Νοθεία: <u>40%</u> , MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>30%</u> , MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>30%</u> , MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>20%</u> , MBC= 25% v/v	Νοθεία: <u>20%</u> , MBC= 25% v/v
	Νοθεία: <u>10%</u> , MBC= 25% v/v	Νοθεία: <u>10%</u> , MBC= 25% v/v

3.2.2 Μέλι Ερείκης

Η ελάχιστη συγκέντρωση μελιού Ερείκης που απαιτείται έναντι του βακτηρίου *S.aureus* είναι ίση με 50% v/v. Η νοθεία του μελιού είτε με την προσθήκη ισογλυκόζης είτε με σουκρόζη επηρεάζει σημαντικά την βακτηριοκτόνο δράση , για αυτό απαιτείται για όλες τις συγκεντρώσεις νοθείας τουλάχιστον 50% v/v μέλι.

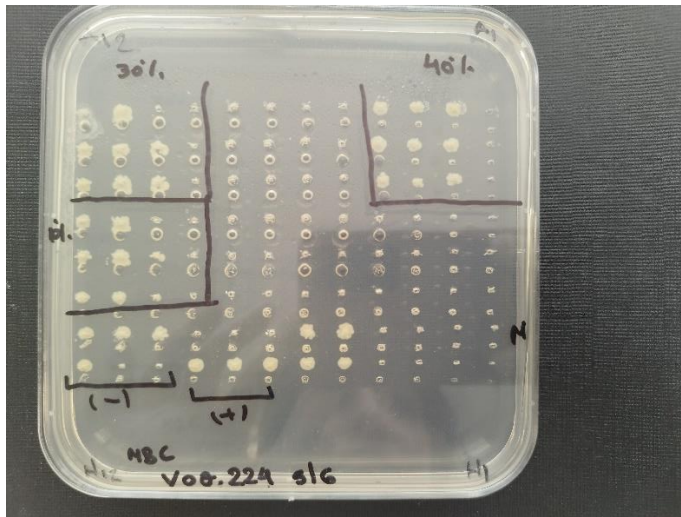
Πίνακας 8. MBC (minimum bactericidal concentration) του μελιού από Ερείκη έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

<u>MBC- ΜΕΛΙ ΕΡΕΙΚΗΣ</u>

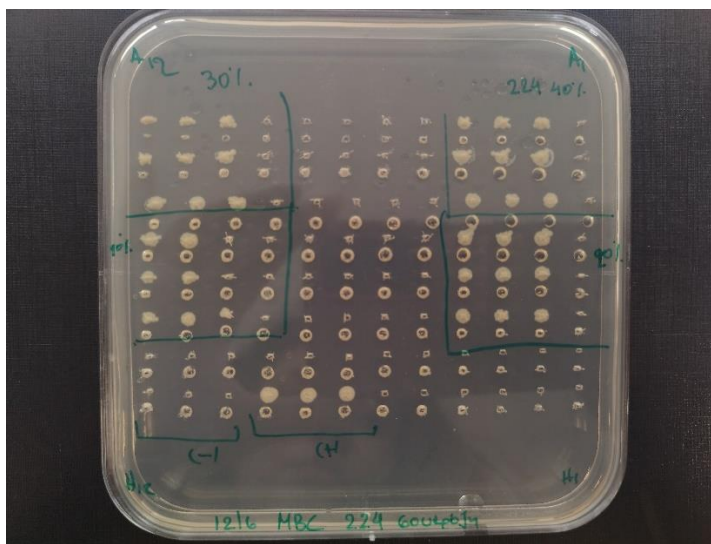
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ</u> <u>ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ</u> <u>ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
<u>MBC= 50% v/v</u>	Νοθεία: <u>40%</u> , MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>30%</u> , MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>30%</u> , MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>20%</u> , MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>20%</u> , MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>10%</u> , MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>10%</u> , MBC= 50% v/v



Εικόνα 1.3: Τριβλύο Petri στο οποίο απεικονίζεται η ελάχιστη βακτηριοκτόνος δράση (MBC) του μελιού Ερείκης (224) έναντι του *Staphylococcus aureus*.



Εικόνα 1.4: Τριβλύο Petri στο οποίο απεικονίζεται η ελάχιστη βακτηριοκτόνος δράση (MBC) του νοθευμένου από ισογλυκόζη μελιού Ερείκης σε διάφορα ποσοστά νοθείας έναντι του *Staphylococcus aureus*.



Εικόνα 1.5: Τριβλύο Petri στο οποίο απεικονίζεται η ελάχιστη βακτηριοκτόνος δράση (MBC) του νοθευμένου από σουκρόζη μελιού Ερείκης σε διάφορα ποσοστά νοθείας έναντι του *Staphylococcus aureus*.

3.2.3 Μέλι από βαμβάκι

Η MBC για το ανόθευτο μέλι βαμβακιού είναι 25% v/v. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η νοθεία από ισογλυκόζη επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση του μελιού σε υψηλές συγκεντρώσεις νοθείας όπως είναι 30% και 40%,

κατά τις οποίες απαιτείται διπλάσια ποσότητα μελιού προκειμένου να θανατωθεί το βακτήριο, ενώ σε μικρά ποσοστά νοθείας της τάξης 10% και 20% η MBC παραμένει σταθερή 25% v/v. Αντίθετα, η νοθεία με σουκρόζη φαίνεται να είναι πιο ισχυρή, καθώς επηρεάζει και τα τέσσερα ποσοστά νοθείας τα οποία από 25% v/v καταλήγουν σε 50% v/v.

Πίνακας 9. MBC (minimum bactericidal concentration) του μελιού από Ερείκη έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

<u>MBC- ΜΕΛΙ ΑΠΟ ΒΑΜΒΑΚΙ</u>		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
<u>MBC= 25% v/v</u>	Νοθεία: <u>40%</u>, MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>40%</u>, MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>30%</u>, MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>30%</u>, MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>20%</u>, MBC= 25% v/v	Νοθεία: <u>20%</u>, MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>10%</u>, MBC= 25% v/v	Νοθεία: <u>10%</u>, MBC= 50% v/v

3.2.4 Μέλι καστανιάς

Η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση του ανόθευτου μελιού καστανιάς είναι ίση με 25% v/v. Η νοθεία με διάλυμα τόσο ισογλυκόζης όσο και σουκρόζης έχει επηρεάσει σημαντικά την αντιμικροβιακή δράση του μελιού, καθώς απαιτείται διπλάσια ποσότητα, 50% v/v μελιού καστανιάς για όλες τις συγκεντρώσεις νοθείας προκειμένου να θανατωθεί το βακτήριο *Staphylococcus aureus*.

Πίνακας 10. MBC (minimum bactericidal concentration) του μελιού καστανιάς έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

<u>MBC- ΜΕΛΙ ΚΑΣΤΑΝΙΑΣ</u>		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
<u>MBC= 25% v/v</u>	Νοθεία: <u>40%</u>, MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>40%</u>, MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>30%</u>, MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>30%</u>, MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>20%</u>, MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>20%</u>, MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>10%</u>, MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>10%</u>, MBC= 50% v/v

3.2.5 Πευκόμελο

Η ελάχιστη συγκέντρωση πευκόμελου που απαιτείται έναντι του βακτηρίου *S.aureus* είναι ίση με 25% v/v. Η νοθεία με ισογλυκόζη στα ποσοστά 20%, 30% και 40% επηρεάζει την MBC του μελιού, η οποία αυξάνεται στο 50% v/v, ενώ στο ποσοστό νοθείας 10% παραμένει σταθερή η MBC= 25% v/v. Όσον αφορά τη νοθεία με σουκρόζη, η MBC επηρεάζεται και από τις τέσσερις συγκεντρώσεις νοθείας και από 25% v/v αυξάνεται στο 50% v/v.

Πίνακας 11. MBC (minimum bactericidal concentration) του μελιού καστανιάς έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*

MBC- ΠΕΥΚΟΜΕΛΟ		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
<u>MBC= 25% v/v</u>	Νοθεία: <u>40%</u> , MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>40%</u> , MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>30%</u> , MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>30%</u> , MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>20%</u> , MBC= 50% v/v	Νοθεία: <u>20%</u> , MBC= 50% v/v
	Νοθεία: <u>10%</u> , MBC= 25% v/v	Νοθεία: <u>10%</u> , MBC= 50% v/v

3.2.6 Μέλι Manuka

Η MBC για το ανόθευτο μέλι Manuka είναι 6,25% v/v. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η νοθεία με ισογλυκόζη στα ποσοστά 30% και 40% επηρέασε την βακτηριοκτόνο δράση του μελιού, καθώς η MBC αυξήθηκε στα 50% v/v. Αντίθετα, η νοθεία με σουκρόζη επηρέασε την MBC του μελιού σε όλα τα ποσοστά νοθείας, η οποία αυξήθηκε για το 10%, 20% και 30% στο 12,5% v/v, ενώ στο 40% έφτασε το 25% v/v.

Πίνακας 12. MBC (minimum bactericidal concentration) του μελιού manuka έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*

<u>MBC- MANUKA</u>		
<u>ΑΝΟΘΕΥΤΟ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ</u> <u>ΙΣΟΓΛΥΚΟΖΗ</u>	<u>ΝΟΘΕΥΜΕΝΟ ΜΕ</u> <u>ΣΟΥΚΡΟΖΗ</u>
<u>MBC= 6,25% v/v</u>	Νοθεία: <u>40%</u>, MBC=12,5% v/v	Νοθεία: <u>40%</u>, MBC=25% v/v
	Νοθεία: <u>30%</u>, MBC=12,5% v/v	Νοθεία: <u>30%</u>, MBC=12,5% v/v
	Νοθεία: <u>20%</u>, MBC=6,25% v/v	Νοθεία: <u>20%</u>, MBC=12,5% v/v
	Νοθεία: <u>10%</u>, MBC= 6,25% v/v	Νοθεία <u>10%</u>, MBC=12,5% v/v

Κεφάλαιο 4° : Συζήτηση

4.1 Επίδραση της νοθείας στην αντιμικροβιακή δράση του μελιού

Κρίνεται απαραίτητο να αναφερθεί ότι πρώτη φορά πραγματοποιείται μελέτη που αφορά την νοθεία του μελιού και πως αυτή επηρεάζει την αντιμικροβιακή του δράση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην υπάρχει σχετική διεθνής βιβλιογραφία ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα μας.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων είναι εμφανές ότι η νοθεία επηρέασε σημαντικά την αντιμικροβιακή δράση του μελιού. Η επίδραση της νοθείας με σουκρόζη ήταν πιο ισχυρή όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση του μελιού σε σχέση με την νοθεία από ισογλυκόζη, γεγονός που διευκολύνει την ανίχνευση της σε περιπτώσεις νοθείας.

Ειδικότερα:

A) Θυμαρίσιο μέλι: Η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται στο ανόθευτο μέλι προκειμένου να αναστείλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών είναι 25% v/v. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση παραμένει σταθερή για την νοθεία από ισογλυκόζη, ενώ αυξάνεται στο διπλάσιο όταν πραγματοποιείται νοθεία από σουκρόζη για ποσοστά 30% και 40%. Η νοθεία επηρεάζει και την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση μελιού που απαιτείται. Η ποσότητα που απαιτείται στα νοθευμένα μέλια είναι η διπλάσια απ' ότι στα μη νοθευμένα.

B) Μέλι Ερείκης: Όσον αφορά το μέλι ερείκης, η MIC του τόσο στην ανόθευτή όσο και στην νοθευμένη από ισογλυκόζη μορφή είναι ίση με 25% v/v. Η νοθεία από σουκρόζη αυξάνει κατά το διπλάσιο (50% v/v) την ποσότητα του μελιού που απαιτείται προκειμένου να ανασταλεί η ανάπτυξη του βακτηρίου. Αντίθετα, η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση που απαιτείται ώστε να θανατωθεί το βακτήριο φαίνεται να είναι η ίδια και για το ανόθευτο μέλι αλλά και για το νοθευμένο από ισογλυκόζη και σουκρόζη (50% v/v).

Γ) Μέλι από Βαμβάκι: Η νοθεία με σουκρόζη επηρέασε ακόμα και σε μικρά ποσοστά νοθείας την MIC του μελιού. Η MIC του νοθευμένου μελιού έμεινε ανεπηρέαστη από την προσθήκη ισογλυκόζης. Παρόλα αυτά, η MBC επηρεάστηκε από την προσθήκη ισογλυκόζης, η οποία χρειάστηκε για τα ποσοστά νοθείας 30% και 40% τουλάχιστον 50% v/v ποσότητα μελιού ώστε να θανατωθεί το βακτήριο.

Δ) Μέλι Καστανιάς: Το μέλι καστανιάς επηρεάστηκε εξίσου από την νοθεία. Όσον αφορά την μέτρηση η MIC, η ελάχιστη ποσότητα μελιού που χρειάστηκε για τα ποσοστά νοθείας της τάξης 30% και 40% για ισογλυκόζη και σουκρόζη ήταν διπλάσια σε σχέση με το ανόθευτο μέλι. Επιπλέον, η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση για όλα τα ποσοστά νοθείας είναι διπλάσια συγκριτικά με το ανόθευτο μέλι.

Ε) Πευκόμελο: Η MIC του πευκόμελου επηρεάστηκε κυρίως από τη νοθεία με σουκρόζη, η οποία διπλασιάστηκε συγκριτικά με το ανόθευτο μέλι και το νοθευμένο από ισογλυκόζη. Αντίθετα, η MBC του μελιού αυξήθηκε τόσο με την νοθεία από ισογλυκόζη όσο και με σουκρόζη.

ΣΤ) Μέλι Manuka: Το μέλι Manuka αποτέλεσε μέτρο σύγκρισης για την αντιβακτηριακή δράση των μελιών. Είχε την μικρότερη MIC και MBC (6,25% v/v), η οποία επηρεάστηκε και από τους δύο τύπους νοθείας.

Συμπερασματικά, η νοθεία επηρέασε όλων των ειδών τα μέλια όσον αφορά την αντιμικροβιακή τους δράση. Τα μέλια που επηρεάστηκαν κυρίως φαίνεται να είναι το μέλι από καστανιά και από βαμβάκι, πιθανώς λόγω των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων και των υψηλών ποσοστών σακχάρων που διαθέτουν στα συστατικά τους. Επίσης, φαίνεται ότι η MBC επηρεάζεται μάλλον περισσότερο από την νοθεία και άρα θα μπορούσε να αποτελέσει πιο ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση της νοθείας σε σύγκριση με την MIC. Τέλος, η παρούσα πτυχιακή μπορεί να αποτελέσει εναρκτήριο λάκτισμα για την διερεύνηση και άλλων μελιών και πως η νοθεία επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μελιού πέραν της αντιμικροβιακής.

Βιβλιογραφία

1. Alaerjani, W.M.A., Abu-Melha, S., Alshareef, R.M.H., Al-Farhan, B.S., Ghramh, H.A., Al-Shehri, B.M.A., Bajaber, M.A., Khan, K.A., Alrooqi, M.M., Modawe, G.A., et al. (2022). *Biochemical reactions and their biological contributions in honey*. Molecules, 27(15), 4719. <https://doi.org/10.3390/molecules27154719>
2. Alissandrakis, E., Kibaris, A.C., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C., & Polissiou, M. (2005). *Flavour compounds of Greek cotton honey*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85, 1444-1452. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2124>
3. Al-Mamary, M., Al-Meer, A., & Al-Habori, M. (2002). *Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey*. Nutrition Research, 22, 1041-1047. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00406-2)
4. Almasaudi, S. (2021). *The antibacterial activities of honey*. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(4), 2188-2196. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.017>
5. Almasaudia, S. B., Al-Naharia, A. A. M., AbdEl-Ghanyb, E. M., Barbourc, E., Al Muhayawie, S. M., Al-Jaounif, S., Azharg, E., Qarif, M., Qarih, Y. A., & Harakehg, S. (2017). *Antimicrobial effect of different types of honey on Staphylococcus aureus*. Saudi Journal of Biological Sciences, 24, 1255–1261. <https://doi.org/10.3390/foods10061402>
6. Almeida-Muradian, L.B., Stramm, K.M., Horita, A., Barth, O.M., Freitas, A.S., & Estevinho, L.M. (2013). *Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from Melipona subnitida and Apis mellifera*. International Journal of Food Science and Technology, 48, 1698-1706. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12140>
7. Alvarez-Suarez, J.M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T.Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). *The composition and biological activity of

- honey: A focus on Manuka honey*. *Foods*, 3(3), 420-432.
<https://doi.org/10.3390/foods3030420>
8. Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A., & Battino, M. (2009). *Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey: A review*. *Current Analytical Chemistry*, 5, 293-302.
<https://doi.org/10.2174/15734110978907776>
 9. Al Waili, N. S., Salom, K., Butler, G., & Al Ghamdi, A. A. (2011). *Honey and microbial infections: A review supporting the use of honey for microbial control*. *Journal of Medicinal Food*, 14(10), 1079-1096.
 10. Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J.P., & Molle, V. (2021). *Staphylococcus aureus toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments*. *Toxins*, 13(10), 677. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>
 11. Anklam, E. (1998). *A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey*. *Food Chemistry*, 63(4), 549-562. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00057-0)
 12. Anthimidou, E., & Mossialos, D. (2013). *Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in comparison to Manuka honey*. *Journal of Medicinal Food*, 16(1). <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0042>
 13. BACANDRILSOS, N., Papadopoulou, P., Vavoulidou, F., & Tsiroyiannis (B. Τσιρογιάννης), V. (2018). *Some physicochemical characteristics of cotton and citrus Greek honeys*. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 51(3), 200-204. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15675>
 14. Balayiannis, G., & Balayiannis, P. (2008). *Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 462-470. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9126-x>
 15. Bertonecelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). *Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey*. *Food Chemistry*, 105, 822-828.

16. Bocian, A., Buczkowicz, J., Jaromin, M., Hus, K.K., & Legáth, J. (2019). *An effective method of isolating honey proteins*. *Molecules*, 24(13), 2399.
17. Bogdanov, S. (2011a). *Honey technology*. In S. Bogdanov (Ed.), *The honey book* (pp. 15-18). Retrieved from <http://www.bee-hexagon.net/honey/>
18. Bogdanov, S. (2011b). *Physical properties*. In S. Bogdanov (Ed.), *The honey book* (pp. 19-27). Retrieved from <http://www.bee-hexagon.net/honey/>
19. Bogdanov, S. (2011c). *Honey composition*. In S. Bogdanov (Ed.), *The honey book* (pp. 27-36). Retrieved from <http://www.bee-hexagon.net/honey/>
20. Bogdanov, S. (2015). *Honey as nutrient and functional food*. In S. Bogdanov (Ed.), *The honey book* (pp. 1-48). Retrieved from <http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/HealthHoney/8HoneyNutrientFunctionalReview.pdf>
21. Boucher, H. W., & Corey, G. R. (2008). *Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 46(Suppl 5), S344-S349. <https://doi.org/10.1086/533591>
22. Brudzynski, K. (2020). *A current perspective on hydrogen peroxide production in honey: A review*. *Food Chemistry*, 332, 127229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127229>
23. Chua, L.S., Lee, J.Y., & Chan, G.F. (2013). *Honey protein extraction and determination by mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 3063-3074.
24. Codex Alimentarius. (2001). *EUR-Lex - 32001L0110 - EL*. europa.eu.
25. Cooper, R. A., Molan, P. C., & Harding, K. G. (1999). *Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92(6), 283-285. <https://doi.org/10.1177/014107689909200604>
26. da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C., & Fett, R. (2016). *Honey: Chemical composition, stability and authenticity*. *Food*

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>

27. Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). *The evolution of *Staphylococcus aureus**. Infection, Genetics and Evolution, 8(6), 747-763. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>
28. Dimitrios, S., Soulitsiotis, N., Tsadila, C., Papaeconomou, S., Arvanitis, C., Ntontos, A., Karkanta, F., Adamou-Androulaki, S., Petrotos, K., Spandidos, D. A., Kouretas, D., & Mossialos, D. (2018). *Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece*. International Journal of Molecular Medicine, 42, 726-734. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3656>
29. Drewnowski, A., & Gomez-Carneros, C. (2000). *Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: A review*. The American Journal of Clinical Nutrition, 72(6), 1424-1435. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.6.1424>
30. Ekici, L., Sagdic, O., Silici, S., & Ozturk, I. (2014). *Determination of phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Turkish pine honey*. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 6(4), 439-444. <https://doi.org/10.3920/QAS2013.0376>
31. Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2014). *Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon*. Food Chemistry, 149, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.125>
32. Gkoutzouvelidou, M., Panos, G., Xanthou, M. N., Papachristoforou, A., & Giaouris, E. (2021). *Comparing the antimicrobial actions of Greek honeys from the island of Lemnos and Manuka honey from New Zealand against clinically important bacteria*. Foods, 10(6), 1402. <https://doi.org/10.3390/foods10061402>
33. Gonzalez-Paramás, A.M., Gomez-Barez, J.A., Cordón-Marcos, C., García-Villanova, R.J., & Sánchez-Sánchez, J. (2006). *HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen)*. Food Chemistry, 95, 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.008>

34. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., & Bobilya, D.J. (2002). *Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. Journal of Nutritional Biochemistry, 13, 572-584.
35. Henriques, A. F., Jenkins, R. E., Burton, N. F., & Cooper, R. A. (2010). *The intracellular effects of manuka honey on Staphylococcus aureus*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 29(1), 45-50. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0817-2>
36. Hossain, M.L., Lim, L.Y., Hammer, K., Hettiarachchi, D., & Locher, C. (2022). *A review of commonly used methodologies for assessing the antibacterial activity of honey and honey products*. Antibiotics, 11(7), 975. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070975>
37. Karabagias, I.K., Maia, M., Karabagias, V.K., Gatzias, I., & Badeka, A.V. (2018). *Characterization of Eucalyptus, Chestnut and Heather Honeys from Portugal Using Multi-Parameter Analysis and Chemo-Calculus*. Foods, 7(12), 194. <https://doi.org/10.3390/foods7120194>
38. Karabagias, I.K., Vavoura, M.V., Badeka, A., Kontakos, S., & Riganakos, K.A. (2014). *Differentiation of Greek Thyme Honeys According to Geographical Origin Based on the Combination of Phenolic Compounds and Conventional Quality Parameters Using Chemometrics*. Food Analytical Methods, 7, 2113-2121. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9851-5>
39. Karabournioti, S.E., Tsiropidis, I., Thrasyvoulou, A., & Eleftheriou, E.P. (2009). *Melissopalynological attributes of some Greek thyme honeys*. Journal of Apicultural Research, 48(2), 104-114. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.2.04>
40. Karampourni, S. (2008). *Η μελισσοπαλυνολογική ανάλυση θυμαρίσιου μελιού περιοχών της Ελλάδας* [Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης]. didaktorika.gr.
41. Kafantaris, I., Tsadila, C., Nikolaidis, M., Tsavea, E., Dimitriou, T. G., Iliopoulos, I., Amoutzias, G. D., & Mossialos, D. (2021). *Transcriptomic analysis of Pseudomonas aeruginosa response to pine honey via RNA sequencing indicates multiple mechanisms of antibacterial activity*. Foods, 10(5), 936. <https://doi.org/10.3390/foods10050936>

42. Kasiotis, K.M., Baira, E., Iosifidou, S., Bergele, K., Manea-Karga, E., Theologidis, I., Barmponi, T., Tsipi, D., & Machera, K. (2022). *Characterization of Ikaria Heather Honey by Untargeted Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Metabolomics and Melissopalynological Analysis*. *Frontiers in Chemistry*, 10, 924881. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.924881>
43. Kolayli, S., Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., & Karaoglu, S. A. (2016). *A comparative study of the antihyaluronidase, antiurease, antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of different unifloral degrees of chestnut (Castanea sativa Mill.) honeys*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup3), 96-104. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1209494>
44. Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., Bacandritsos, N., & Sabatini, A. G. (2004). *Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys*. *Journal of Food Engineering*, 64, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.09.007>
45. León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A.V., & Andrés, M.P.S. (2013). *Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC*. *Food Analytical Methods*, 6, 488-496. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9477-4>
46. Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). *Methods of mellissopalynology*. *Bee World*, 59, 139-151.
47. Majtan, J., Bucekova, M., Kafantaris, I., Szweda, P., Hammer, K., & Mossialos, D. (2021). Honey antibacterial activity: A neglected aspect of honey quality assurance as functional food*. *Trends in Food Science & Technology*, 118*, Part B, 870-886. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.012>
48. Maria Masoura & Konstantinos Gkatzionis. (2022). *The antimicrobial mechanism of Greek thyme honeys against methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates: A case study of comparison with

- Manuka honey. International Journal of Food Science and Technology, 57*(12), 7076-7084. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15864>
49. Molan, P. C. (1992a). The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World, 73(1), 5-28.
 50. Molan, P. C. (1992b). The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. Bee World, 73*(2), 59-76.
 51. Morroni, G., Alvarez-Suarez, J. M., Brenciani, A., Simoni, S., Fioriti, S., Pugnali, A., Giampieri, F., Mazzoni, L., Gasparrini, M., Marini, E., Mingoia, M., Battino, M., & Giovanetti, E. (2018). Comparison of the antimicrobial activities of four honeys from three countries (New Zealand, Cuba, and Kenya). Frontiers in Microbiology, 9*, 1378. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01378>
 52. Naila, A., Flint, S. H., Sulaiman, A., Ajit, A., & Weeds, Z. (2018). *Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants*. Food Control, 90, 152-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.020>
 53. Nousias, P., Karabagias, I.K., Kontakos, S., & Riganakos, K.A. (2017). *Characterization and Differentiation of Greek Commercial Thyme Honeys According to Geographical Origin Based on Quality and Some Bioactivity Parameters Using Chemometrics*. Journal of Food Processing and Preservation, 41, e13061. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13061>
 54. Oddo, L. P., Piazza, M. G., & Pulcini, P. (1999). *Invertase activity in honey*. Apidologie, 30, 57-65.
 55. Osman, S., Silici, S., & Ekici, L. (2013). *Evaluation of the phenolic content, antiradical, antioxidant, and antimicrobial activity of different floral sources of honey*. International Journal of Food Properties, 16(3), 658-666. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.561463>
 56. Patel, S., & Cichello, S. (2013). *Manuka honey: an emerging natural food with medicinal use*. Natural Product Bioprospecting, 3, 121-128. <https://doi.org/10.1007/s13659-013-0018-7>
 57. Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. J Microbiol Methods. 2006 Jan;64(1):84-95.

58. Rao, Q., Shang, W., Hu, X., & Rao, X. (2015). *Staphylococcus aureus* ST121: A globally disseminated hypervirulent clone. *Journal of Medical Microbiology*, 64(12), 1462-1473. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000185>
59. Rasigade, J. P., & Vandenesch, F. (2014). *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 510-514. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.022>
60. Roderick, J. W., Mitchell, K. R., & Allen, K. L. (1999). *Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey*. *Food Chemistry*, 64(3), 295-301. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00100-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00100-9)
61. Ronsisvalle, S., Lissandrello, E., Fuochi, V., Petronio, G., Straquadanio, C., Crascì, L., Panico, A., Milito, M., Cova, A. M., Tempera, G., & Furneri, P. M. (2019). *Antioxidant and antimicrobial properties of Castanea sativa Miller chestnut honey produced on Mount Etna (Sicily)*. *Natural Product Research*, 33(6), 843-850. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1413568>
62. Rodríguez, I., Tananaki, C., Galán-Soldevilla, H., Pérez-Cacho, P. R., & Serrano, S. (2021). *Sensory profile of Greek Islands thyme honey*. *Applied Sciences*, 11(20), 9548. <https://doi.org/10.3390/app11209548>
63. Saad, B. Almasaudia, et al. (2017). *Antimicrobial effect of different types of honey on Staphylococcus aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 1255–1261. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.013>
64. Sagdic, O., Silici, S., & Ekici, L. (2013). *Evaluation of the phenolic content, antiradical, antioxidant, and antimicrobial activity of different floral sources of honey*. *International Journal of Food Properties*, 16(3), 658-666. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.561463>
65. Sagdic, O., Silici, S., & Ekici, L. (2014). *Determination of phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Turkish pine honey*. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 6(4), 439-444. <https://doi.org/10.3920/QAS2013.0376>
66. Sánchez, M. P., Huidobro, J. F., Mato, I., Muniategui Lorenzo, S., & Sancho, M. (2001). *Evolution of invertase activity in honey over two years*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 416-422. <https://doi.org/10.1021/jf0003350>

67. Sapoznik, A., Sales i Favà, L., & Whelan, M. (2023). *Trade, taste and ecology: Honey in late medieval Europe*. *Journal of Medieval History*, 49(2), 252-274. <https://doi.org/10.1080/03044181.2023.2188603>
68. Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2017). *Chemical composition of honey*. In J. M. Alvarez-Suarez (Ed.), *Bee products - Chemical and biological properties* (pp. 43-82). Springer.
69. Scepankova, H., Saraiva, J. A., & Estevinho, L. M. (2017). *Honey health benefits and uses in medicine*. In J. Alvarez-Suarez (Ed.), *Bee products - Chemical and biological properties*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_4
70. Sereti, V., Lazaridou, A., Tananaki, C., et al. (2021). *Development of a cotton honey-based spread by controlling compositional and processing parameters*. *Food Biophysics*, 16(4), 365-380. <https://doi.org/10.1007/s11483-021-09677-9>
71. Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., et al. (2010). *Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-47>
72. Silva, M. S., Rabadzhiev, Y., Renon Eller, M., Iliev, I., Ivanova, I., & Santana, W. C. (2017). *Microorganisms in Honey*. In V. de Alencar & A. A. de Toledo (Eds.), *Honey Analysis*. Toledo. <https://doi.org/10.5772/67262>
73. Stavropoulou, E., Ieronymaki, E., Dimitroulia, E., Constantinidis, T. C., Vrioni, G., Tsatsanis, C., & Tsakris, A. (2022). *Anti-inflammatory and antibacterial effects and mode of action of Greek arbutus, chestnut, and fir honey in mouse models of inflammation and sepsis*. *Microorganisms*, 10(12), 2374. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122374>
74. Szveda P. Antimicrobial Activity of Honey. In: De Alencar Arnaut De Toledo, V., Ed., *Honey Analysis*, Vol. 1., 2017 IntechOpen, London, 215-232.
75. aş-Küçükaydın, M., Tel-Çayan, G., Çayan, F., Küçükaydın, C., Hazar Çiftçi, B., Ceylan, Ö., & Duru, M. E. (2023). *Chemometric classification of chestnut honeys from different regions in Turkey based on their*

- phenolic compositions and biological activities*. Food Chemistry, 415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135727>
76. Tananaki, C., Rodopoulou, M. A., Dimou, M., Kanelis, D., & Liolios, V. (2024). *The Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Nine Monofloral Honey Types*. Applied Sciences, 14(10), 4329. <https://doi.org/10.3390/app14104329>
 77. Thrasyvoulou, A., Tananaki, C., Goras, G., Karazafiris, E., Dimou, M., Liolios, V., Kanelis, D., & Gounari, S. (2018). *Legislation of honey criteria and standards*. Journal of Apicultural Research, 57(1), 88-96. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1411181>
 78. Tsavea, E., Vardaka, F. P., Savvidaki, E., Kellil, A., Kanelis, D., Bucekova, M., Grigorakis, S., Godocikova, J., Gotsiou, P., Dimou, M., et al. (2022). *Physicochemical Characterization and Biological Properties of Pine Honey Produced across Greece*. Foods, 11(7), 943. <https://doi.org/10.3390/foods11070943>
 79. Tsavea, E., & Mossialos, D. (2019). *Antibacterial activity of honeys produced in Mount Olympus area against nosocomial and foodborne pathogens is mainly attributed to hydrogen peroxide and proteinaceous compounds*. Journal of Apicultural Research, 58(5), 756-763. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1649570>
 80. Tsavea, E., Tzika, P., Katsivelou, E., Adamopoulou, A., Nikolaidis, M., Amoutzias, G. D., & Mossialos, D. (2023). *Impact of Mt. Olympus honeys on virulence factors implicated in pathogenesis exerted by Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics, 12(6), 998. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060998>
 81. Tsigouri, A., Passaloglou-Katrali, M., & Sabatakou, O. (2004). *Palynological characteristics of different unifloral honeys from Greece*. Grana, 43(2), 122-128. <https://doi.org/10.1080/00173130310017643>
 82. Valverde, S., Ares, A. M., Elmore, J. S., & Bernal, J. (2022). *Recent trends in the analysis of honey constituents*. Food Chemistry, 387, 132920. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132920>
 83. Visavadia, B. G., Honeysett, J., & Danford, M. H. (2008). *Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections*. British

- Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 46(1), 55-56.
<https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2007.10.011>
84. Willix, D. J., Molan, P. C., & Harfoot, C. G. (1992). *A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey*. Journal of Applied Bacteriology, 73(5), 388-394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04993.x>
85. Xagoraris, M., Revelou, P.-K., Alissandrakis, E., Tarantilis, P.A., & Pappas, C.S. (2021). *Greek honey authentication: Botanical approach*. Encyclopedia, 1, 1322-1333. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1040099>
86. Xagoraris, M., Chrysoulaki, F., Revelou, P.-K., Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., & Pappas, C. S. (2021). *Unifloral autumn heather honey from indigenous Greek Erica manipuliflora Salisb.: SPME/GC-MS characterization of the volatile fraction and optimization of the isolation parameters*. Foods, 10(10), 2487. <https://doi.org/10.3390/foods10102487>