



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2020

ΛΑΡΙΣΑ

ΜΑΣΟΥΡΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

**ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ
ΤΩΝ ΜΕΛΙΩΝ ΚΑΣΤΑΝΙΑΣ ΚΑΙ ΚΟΥΜΑΡΙΑΣ ΤΟΥ ΑΓΙΟΥ ΟΡΟΥΣ**

**METAGENOMIC ANALYSIS OF THE MICROBIOME OF CHESTNUT AND
ARBUTUS HONEY ORIGINATING FROM MOUNT ATHOS**

Τριμελής επιτροπή:

Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων καθηγητής): Επίκουρος καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης: Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στάγκος Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο **Μόσιαλο Δημήτριο (επιβλέπων καθηγητή)** καθώς και τον κύριο **Νικολαΐδη Μάριο** για την στήριξη τους στην εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας.

Περίληψη:

Το μέλι φημίζεται για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες από τους αρχαίους χρόνους και χρησιμοποιείται ως αντισηπτικό. Η αντιμικροβιακή του δράση οφείλεται στην υψηλή οξύτητα και την οσμωτική του πίεση καθώς και σε διάφορες χημικές ενώσεις που αυτό περιέχει. Παρόλα αυτά το μέλι φιλοξενεί μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια και ζύμες. Αυτοί έχουν προέλευση το νέκταρ και το μελίτωμα, που αποτελούν την πρώτη ύλη για την παραγωγή του μελιού, καθώς και τα άνθη, τον αέρα αλλά και την ίδια την μέλισσα. Η παρουσία μικροοργανισμών στο μέλι το καθιστά, εκτός των άλλων μια προβιοτική τροφή με μεγάλη εμπορική αξία. Έτσι, τα τελευταία χρόνια, η έρευνα για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που περιέχονται στα διάφορα είδη μελιού από διάφορες περιοχές του κόσμου έχει ενταθεί. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν, η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που περιέχονται σε δείγματα μελιού κουμαριάς και καστανιάς από το Άγιο Όρος. Για να μελετηθεί το μικροβίωμα τους, το DNA από κάθε δείγμα εκχυλίστηκε με τη μέθοδο Wizard της εταιρείας Promega και για να ελεγχθεί ποιοτικά ενισχύθηκαν οι περιοχές V3-V4 του βακτηριακού γονιδίου *16S rRNA* μέσω PCR. Ακολούθως, τα δείγματα απεστάλησαν στην εταιρεία Macrogen Inc για να γίνει η μεταγονιδιωματική ανάλυση μέσω αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) με τη χρήση του Illumina MiSeq PE300. Αναφορικά με τα βακτήρια, η μεταγονιδιωματική ανάλυση έδειξε ότι στα δείγματα μελιών καστανιάς και κουμαριάς τα *Lactobacillus spp*, *Sphingomonas*, επικρατούν με ποσοστά 31% και 24% αντίστοιχα, ενώ όσον αφορά τους μύκητες οι φυλότυποι που επικρατούν είναι οι *Wickerhamomyces*, *Capnodiales* και *Zygosaccharomyces mellis* με ποσοστά 13,1%, 18,1% και 20,1% αντίστοιχα. Ανάλογες μελέτες έχουν δείξει ότι τα διάφορα είδη μελιού διαφέρουν σημαντικά ως προς το μικροβίωμά τους Έτσι, η ανάλυση έδειξε ότι σε σύγκριση με το παραγόμενο στην Κίνα μέλι Vitex, οι διαφορές στο μικροβίωμα ήταν σημαντικές. Για παράδειγμα, ενώ στο μικροβίωμα του μελιού Vitex κυριαρχεί το γένος *Bacillus spp* (67%) στα δείγματα που μελετήθηκαν τα συγκεκριμένα βακτήρια δεν ξεπερνούσαν το 1% του μικροβιώματος. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι συγκριτικά με το μέλι Vitex, τα δείγματα μελιού καστανιάς και κουμαριάς είχαν πολύ μεγαλύτερη σχετική αφθονία βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* (52% και 12% αντίστοιχα). Η

πιθανότερη πηγή προέλευσης των λακτοβάκιλλων στα δείγματα που μελετήθηκαν, είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας των μελισσών. Δεδομένου ότι τα περισσότερα προβιοτικά συμπληρώματα, που οι διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι έχουν ευεργετική δράση, περιέχουν λακτοβάκιλλους, θεωρούμε ότι αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω το προβιοτικό δυναμικό των διαφόρων ειδών μελιού με μεγάλη σχετική αφθονία λακτοβάκιλλων. Με βάση προηγούμενη έρευνα στο μέλι από έλατο η ομάδα των λακτοβάκιλλων συναντάται ως το υψηλότερο ποσοστό βακτηρίων (82%). Στα δείγματα μελιών καστανιάς και κουμαριάς οι λακτοβάκιλλοι συναντώνται εξίσου σε υψηλό ποσοστό με μέσο όρο 31%

Abstract:

Honey has been known to possess antimicrobial property since ancient times and is used by the folk tradition as an antiseptic. Its antimicrobial activity is due to its high acidity and osmotic pressure as well as to the various chemicals it contains. However, honey harbors microorganisms, mainly bacteria and yeasts. These microbes originate from nectar and honeydew, which are the raw material for honey production, as well as the flowers, the air and the bee itself. The presence of microorganisms in honey makes it, among other things, a probiotic food of great commercial value. Thus, in recent years research on the identification of microorganisms contained in different types of honey from different regions of the world has intensified. The aim of this study was, therefore, to identify the microorganisms contained in chestnut and arbutus honey samples from Mount Athos. To analyze their microbiome, DNA from each sample was extracted using Promega's Wizard method and in order to assess their quality the V3-V4 regions of the bacterial 16S r RNA gene were amplified by PCR. Samples were then sent to MacroGen Inc. for post-genome sequencing (NGS) analysis using Illumina MiSeq PE300. Regarding the bacteria, the post-genomic analysis showed that in the honey samples *Lactobacillus* spp, *Sphingomonas*, predominated at 31% and 24% respectively, while in the case of fungi the dominant phylotypes were, *Wickerhamomyces*, *Capnodiales* and *Zygosaccharomyces mellis*

with rates of 13,1,18,1 and 20,1% respectively. Similar studies from others have shown that honey species differ significantly in their microbiomes. Thus, the analysis showed that compared to China-produced Vitex honey, the differences in microbiomes were significant. For example, while the Vitex honey microbiome was dominated by *Bacillus* spp (67%,) in the samples from Mount Athos these bacteria did not exceed 1% of the microbiome. It was also observed that compared with Vitex honey, the samples from Mount Athos had significantly higher numbers of *Lactobacillus* bacteria (52% and 12%, respectively). The most likely source of lactobacilli in the samples studied is the gastrointestinal tract of bees just as it happens in humans. Since most probiotic supplements, which various studies have shown to have beneficial effects, contain lactobacilli, we strongly believe that it is worth further studying the probiotic potential of different types of honey from all areas of Greek territory. According to a previous method in fir-tree honey, lactobacilli accounts for the highest percentage of bacteria (82%). In the samples of chestnut and arbutus honey, lactobacilli are equally high in 31%.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΕΛΙ-ΟΡΙΣΜΟΣ-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (Codex Stan 12-1981), ως μέλι ορίζεται η φυσική γλυκιά ουσία, που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων, φυτά ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμιγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κερήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν.

Σύμφωνα πάλι με τον ίδιο Κώδικα, το μέλι αποτελείται ουσιαστικά από διάφορα σάκχαρα, κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη, καθώς και άλλες ουσίες όπως οργανικά οξέα, ένζυμα και στερεά σωματίδια που προέρχονται από τη συλλογή μελιού. Το χρώμα του μελιού κυμαίνεται από σχεδόν άχρωμο έως σκούρο καφέ. Στη σύστασή του μπορεί να είναι ρευστό, παχύρευστο ή εν μέρει πλήρως κρυσταλλωμένο. Η γεύση και το άρωμα ποικίλλουν, αλλά και τα δύο έχουν φυτική προέλευση.

Επομένως, σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, το μέλι μπορεί να παραχθεί με την απευθείας συλλογή του φυτικού χυμού ή με την μεσολάβηση εντόμων. Αναλόγως, λοιπόν, διακρίνεται σε μέλι Νέκταρος και μέλι Μελιτώματος.

1.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ-ΣΥΣΤΑΣΗ

Το μέλι είναι ένα υπέρκορο και πυκνό υδατικό διάλυμα κυρίως σακχάρων αλλά και μιας μεγάλης

ποικιλίας άλλων ουσιών. όπως πρωτεΐνες, οργανικά οξέα, ιχνοστοιχεία, αρωματικές ενώσεις, γυρεόκοκκοι κ.α. Αυτά τα συστατικά τα συναντάμε σε όλα τα είδη μελιού σε μεγαλύτερες ή μικρότερες συγκεντρώσεις (Πίνακας 2).

Συστατικό	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	2,4	0,0-8,2
Διασάση φυ)	22,92	8,6-51,0	23,45	10,4-37,2
Προλίνη (mg /Kg)	550	264-1205	452	290-673

Πίνακας 2. Μέση σύσταση του ελληνικού μελιού, με βάση 144 δείγματα από μέλια ανθέων και μελιτωμάτων (Thrasynvoulou and Manikis 1995)

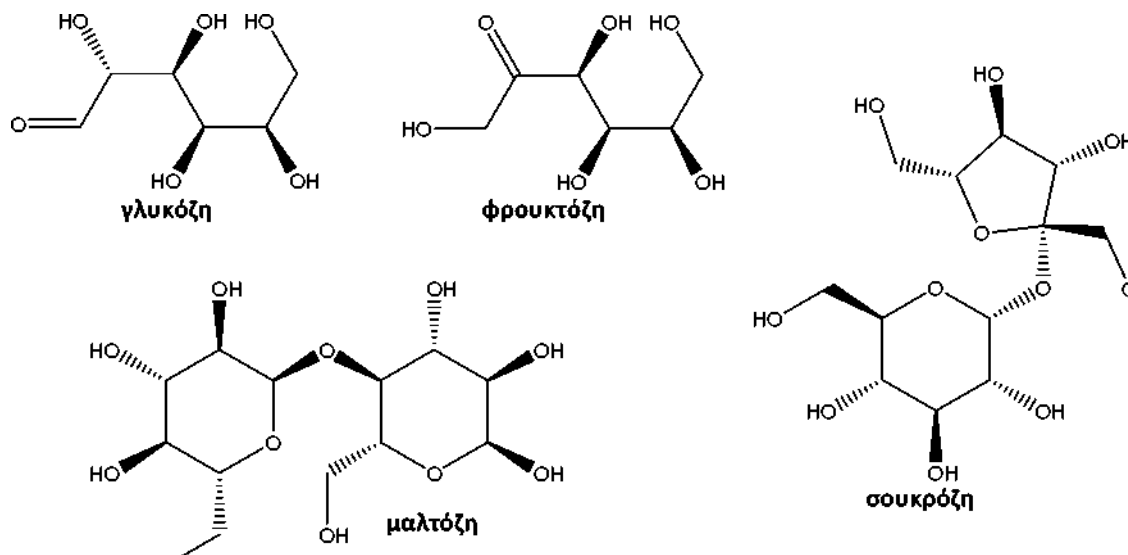
Νερό:

Το ποσοστό του νερού στο μέλι είναι παράγοντας που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ανθεκτικότητα του μελιού στις ζυμώσεις άρα και την ποιότητά του. Το ανθόμελο περιέχει νερό σε ποσοστό 17% περίπου ενώ αυτό των μελιτωμάτων 15.9%. Υπάρχει ένα κατώτερο όριο περιεκτικότητας σε νερό ώστε να διατηρούνται τα σάκχαρα εν διαλύσει ενώ υπάρχει, επίσης και ένα ανώτερο όριο (20%)-23% για το μέλι ερείκης- που έχει θεσπιστεί με την οδηγία 2001/110/EK του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου και έχει να κάνει με την προστασία του τροφίμου από τυχόν ζυμώσεις. Η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό οφείλεται συνήθως σε κακή φύλαξη και παλαιότητα του μελιού και πιο σπάνια σε νοθεία. Η περίσσεια νερού προκαλεί το ξίνισμα του μελιού λόγω ζύμωσης από μύκητες. Το νερό στο μέλι είναι ένας

παράγοντας που επηρεάζει πολλά από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού και καθορίζει και τις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Έτσι, ιδιότητες όπως το χρώμα και το ιξώδες, εξαρτώνται άμεσα από το περιεχόμενο νερό.

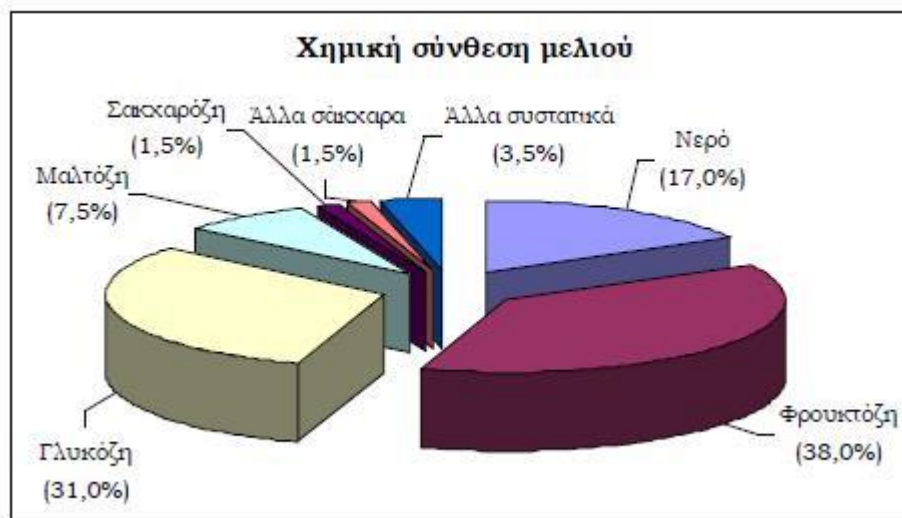
Σάκχαρα: Το μέλι αποτελείται κατά 83% περίπου από σάκχαρα. Έχουν ταυτοποιηθεί 22 διαφορετικά σάκχαρα στο μέλι μέχρι σήμερα. Οι μονοσακχαρίτες φρουκτόζη και γλυκόζη είναι τα σάκχαρα με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο μέλι που, όπως έχει αναφερθεί, δεν υπάρχουν στο νέκταρ ή τα μελιτώματα των φυτών, αλλά προέχονται από την ιμβερτοποίηση της σουκρόζης κατά την επεξεργασία του νέκταρος). Η σουκρόζη (δισακχαρίτης) είναι το βασικότερο σάκχαρο του νέκταρος αλλά και των μελιτωμάτων ενώ υπάρχει και σε μικρή συγκέντρωση (2,5%) στο μέλι (**Σχήμα 1** .Το μέλι περιέχει και άλλους δισακχαρίτες σε ποσοστό 7,3% (μαλτόζη, η μελεζιτόζη κ.α.). Στο μέλι απαντάται επίσης πληθώρα ολιγοσακχαριτών, δηλ. σύνθετα σάκχαρα (ισομαλτόζη, ραφινόζη, τρεχαλόζη, κελλοβιόζη κ.α). Η μέση σύσταση των σακχάρων σε ένα μέλι διαφέρει ανάλογα με το αν αυτό προέρχεται από νέκταρ (ανθόμελο) ή είναι από μελιτώματα ([Thrasyvoulou and Manikis 1995](#)). Έτσι, τα ανθόμελα είναι πλουσιότερα σε απλά σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) συγκριτικά με αυτά που προέρχονται από μελιτώματα. Τα αμιγή ανθόμελα δεν περιέχουν μαλτόζη σε αντίθεση με το μέλι μελιτωμάτων όπου η μαλτόζη ξεπερνά σε συγκέντρωση τη σουκρόζη. Η μεγάλη ποικιλία των

σακχάρων του μελιού δεν καθιστά το μέλι απλώς μια γλυκαντική τροφή. Στους υδατάνθρακες που



περιέχει οφείλεται ότι το μέλι έχει την ικανότητα να κρατά χαμηλή την υγρασία και επομένως να έχει μεγάλη διάρκεια ζωής. Τέλος, τα σάκχαρα έχουν καταλυτική συνεισφορά στο χρώμα και τη γεύση του μελιού. Οι υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων στο μέλι του προσδίδουν χαρακτηριστικές φυσικές ιδιότητες, όπως υψηλή πυκνότητα, μεγάλο ιξώδες, υγροσκοπικότητα τάση για κρυστάλλωση και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Σχήμα 1: Χημική δομή των σημαντικότερων σακχάρων του μελιού.



Οργανικά οξέα: Το μέλι περιέχει περίπου 20 διαφορετικά οργανικά οξέα. Τέτοια είναι το κιτρικό οξύ, το οξικό, το βουτυρικό, το γλυκονικό, το οξαλικό κ.α. Το γλυκονικό οξύ είναι το σημαντικότερο από τα οργανικά οξέα του μελιού και δημιουργείται από την επίδραση του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζη, όπου παράγεται και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Μεγάλο μέρος της αντιμικροβιακής δράσης του μελιού οφείλεται στο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το γλυκονικό οξύ, επίσης, ανάλογα με τη συγκέντρωσή του στο μέλι, έχει την ιδιότητα να κάνει πιο έντονη τη γεύση του. Τέλος, τα οργανικά οξέα, παίζουν καθοριστικό ρόλο στο pH καθώς στη γεύση και στο άρωμα του μελιού. Το pH του μελιού κυμαίνεται μεταξύ 3,3 και 5,9, έχει δηλ. όξινη αντίδραση.

Πρωτεΐνες και αμινοξέα του μελιού: Το μέλι περιέχει 20 διαφορετικές πρωτεΐνες και 18 αμινοξέα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες αποτελούν το 0,2% της μέσης σύστασης του μελιού και προέρχονται αποκλειστικά από το νέκταρ, τις μελιτώδεις εκκρίσεις και τη γύρη. Αυτές οι οργανικές ενώσεις υπάρχουν στο μέλι διότι αποτελούν πολύ σημαντική τροφή για τις μέλισσες. Χωρίς τις πρωτεΐνες και τ' αμινοξέα ο γόνος δεν αναπτύσσεται και το μελίσι τελικά

πεθαίνει. Η κυριότερη πρωτεΐνη στο μέλι είναι η αλβουμίνη. Μερικά από τα' αμινοξέα του μελιού προέρχονται από την μέλισσα και είναι κοινά σε όλα τα μέλια ενώ άλλα έχουν προέλευση τα φυτά (White 1975α). Τα αμινοξέα του μελιού, τα μονομερή των πρωτεϊνών, προέρχονται από τις μέλισσες και βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο μέλι (0,05-0,1%) και έχουν μικρή θρεπτική συνεισφορά. Το σημαντικότερο από τα αμινοξέα είναι η προλίνη. Βρίσκεται στη σίελο των μελισσών και ρυθμίζει την προσθήκης ιμβερτάσης στο νέκταρ και στα μελιτώματα.

Πτητικά συστατικά του μελιού: Από τα χαρακτηριστικά του μελιού_η γεύση και το άρωμα είναι τα σημαντικότερα από αυτά που καθορίζουν την προτίμηση του από τον καταναλωτή. Το άρωμα του μελιού προέρχεται από τις περιεχόμενες πτητικές ουσίες οι οποίες έχουν διάφορες πηγές προέλευσης,. Τέτοιες είναι η φυτική πηγή και η ποιότητα του νέκταρος, η ίδια η μέλισσα που επεξεργάζεται το μέλι και τα υπολείμματα κεριού ή πρόπολης. Τέλος, το άρωμα του μελιού επηρεάζεται από τις συνθήκες αποθήκευσης, όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος χώρου (Αλυσσανδράκης, 2007). Οι πτητικές ουσίες που περιέχονται στο μέλι είναι ιδιαίτερα ετερογενείς: τερπενοειδή, φαινολικές και αζωτούχες ενώσεις, νορισοπρενοειδή, λιπαρά οξέα και εστέρες αυτών, αλδεΐδες, αλδεΐδες κλπ. Το άρωμα που έχει το μέλι προκύπτει από το σύνολο των πτητικών του συστατικών τόσο από ποιοτική όσο και από ποσοτική πλευρά. Η πιο σημαντική παράμετρος με την οποία μια πτητική ουσία συνεισφέρει στο άρωμα ενός τροφίμου, αρά και του μελιού, είναι η ουδός της οσμής αυτής, που ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας που επαρκεί ώστε να γίνει αντιληπτή από τους οσφρητικούς αδένες. Τέτοιες ουσίες είναι κυρίως αρωματικές αλδεΐδες, όπως η βενζαλδεΐδη και η φαινυλακεταλδεΐδη, ουσίες που απαντώνται σε πολλούς διαφορετικούς τύπους μελιών. Θα πρέπει να

σημειωθεί ότι οι πτητικές ενώσεις δεν καθορίζουν μόνο την εμπορική αξία του μελιού αλλά αποτελούν και δείκτες της βοτανικής και της γεωγραφικής προέλευσης του μελιού, καθώς η σύσταση των διαφόρων τύπων μελιού σ' αυτές τις ουσίες διαφέρει σημαντικά. Επομένως, οι πτητικές ουσίες χρησιμοποιούνται ως βοτανικοί δείκτες για τη διάκριση των διαφορετικών τύπων μελιού, γεγονός πολύ σημαντικό για την πάταξη του φαινομένου της παραπλάνησης του καταναλωτή με ψεύτικες ετικέτες στα μέλια του εμπορίου.

HMF: Η HMF (5-υδροξυμεθυλο-2-φουρανοκαρβοξαλδεϋδη ή Υδροξυμεθυλοφουρουράλη) υπάρχει σε όλα τα μέλια, σε ποικίλες συγκεντρώσεις και ανήκει στα παράγωγα του φουρανίου. Όπως και άλλες ενώσεις αυτής της κατηγορίας παράγεται κατά τη θέρμανση του μελιού, ακόμα και στους 50°C ή κατά την παρατεταμένη αποθήκευσή του (Αλυσσανδράκης, 2007). Η HMF αποτελεί κριτήριο ποιότητας του μελιού. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία, η συγκέντρωσή της δεν πρέπει να ξεπερνά τα 40mg /Kg, με εξαίρεση μέλια με χαμηλή περιεκτικότητα σε διαστάση, για τα οποία το όριο της HMP είναι 15mg /Kg (π.χ. μέλι πορτοκαλιάς). Η HMF απαντάται και σε άλλα τρόφιμα, όπως σε φρουτοχυμούς και γάλα τύπου UHT. Υψηλές ποσότητες HMF βρίσκονται και στον καφέ καθώς και σε αποξηραμένα φρούτα. Για παράδειγμα, στον καβουρδισμένο καφέ οι συγκεντρώσεις της κυμαίνονται μεταξύ 300 και 2900 mg/kg. Τόσο κατά τη διάσπαση των μονοσακχαριτών στο όξινο περιβάλλον του ώριμου μελιού όσο και κατά τη θέρμανσή του παράγεται HMF (αντίδραση Maillard). Η θερμοκρασία, οι συνθήκες αποθήκευσης του μελιού και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες καθορίζουν το σχηματισμό της HMF στο μέλι (Αλυσσανδράκης, 2007).

Γυρεόκοκκοι: Οι γυρεόκοκκοι στο μέλι περιέχονται σε σημαντικό αριθμό και έχουν ως προέλευση τα φυτά από τα οποία η μέλισσα συλλέγει το νέκταρ ή το μελίτωμα. Έτσι, τα μέλια κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την αναλογία των γυρεόκοκκων στο μέλι και τον συνολικό αριθμό αυτών σε αμιγή μέλια,

ανθόμελα ή μέλια μελιτώματος. Για να θεωρηθεί ένα μέλι ως αμιγές για ένα φυτό θα πρέπει να περιέχει γυρεόκοκκους από αυτό το φυτό σε κάποια συγκεκριμένη αναλογία και πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο. Για παράδειγμα, το καστανόμελο για να χαρακτηριστεί αμιγές θα πρέπει να περιέχονται σε αυτό γυρεόκοκκοι από καστανιά σε ποσοστό μεγαλύτερο από 87% και παράλληλα συνολικός αριθμός γυρεόκοκκων να ξεπερνά τους 100.000/10γρ. Φυσικά, αυτοί οι αριθμοί διαφέρουν πολύ μεταξύ των διάφορων τύπων μελιών. Για παράδειγμα, το αμιγές μέλι πορτοκαλιάς θα πρέπει να περιέχει γυρεόκοκκους από εσπεριδοειδή σε ποσοστό μεγαλύτερο του 3% με τον συνολικό αριθμό όχι μεγαλύτερο του 70.000/10γρ. Στην περίπτωση του ανθόμελου οι γυρεόκοκκοι προέρχονται από πολλά φυτά και οι αναλογίες τους ποικίλουν. Στα δε μέλια μελιτώματος απαντώνται γυρεόκοκκοι από διάφορα φυτά, ενώ μετά από φυγοκέντρηση υδατικού διαλύματος τέτοιου μελιού στο ίζημα που προκύπτει εντοπίζονται σπόρια από μικροοργανισμούς το οποίο είναι χαρακτηριστικό των μελιών από μελιτώματα. Η γυρεοσκοπική ανάλυση του μελιού έχει καθοριστική σημασία για την εύρεση της βοτανικής προέλευσης του μελιού και επιπλέον είναι χρήσιμη και για τον εντοπισμό της νοθείας του μελιού από μέλια εισαγωγής. (Καραμπουρνιώτη, 2002).

1.3 ΓΕΥΣΗ & ΑΡΩΜΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ

Η γεύση και το άρωμα του μελιού οφείλονται στην αλληλεπίδραση πολλών συστατικών του. Τα οργανικά οξέα, με σημαντικότερο το γλυκονικό, καθορίζουν την οξύτητα του μελιού και συμμετέχουν στη γεύση του. Καθοριστικός παράγοντας για τη γεύση που θα έχει το μέλι αποτελεί και η σύνθεση των σακχάρων του μελιού. Όπως έχουμε αναφέρει, τα σημαντικότερα σάκχαρα του μελιού είναι φρουκτόζη και γλυκόζη, ενώ ακολουθούν η σουκρόζη και η μαλτόζη. Το σάκχαρο με την πιο γλυκιά γεύση είναι η φρουκτόζη ενώ ακολουθούν η σουκρόζη η γλυκόζη και η μαλτόζη. Επίσης, η περιεκτικότητα σε μεταλλικά

στοιχεία επηρεάζει τη γεύση του μελιού. Τα σκούρα μέλια έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε μέταλλα και πιο έντονη γεύση. Το νάτριο (Na) εντείνει τη γεύση και περιέχεται σε τετραπλάσια ποσότητα στα σκούρα μέλια. Επίσης, το θείο (S) προσδίδει έντονο άρωμα στο μέλι. Σε ορισμένους τύπους μελιού, όπως αυτό από ρείκι, οι πρωτεΐνες ευθύνονται κατά ένα μεγάλο μέρος για την ξεχωριστή γεύση τους ενώ η πικρή γεύση ορισμένων μελιών οφείλεται στις τανίνες που αυτά περιέχουν (White, 1975α). Σημαντική επίδραση στο άρωμα του μελιού έχει και η αποθήκευσή του μιας και όταν είναι παρατεταμένη μεταβάλλει τη σύσταση των πτητικών συστατικών του. Έτσι, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του μελιού μειώνονται οι συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών ενώ παράλληλα αυξάνονται οι ποσότητες εκείνων των ουσιών που ανήκουν στα παράγωγα του φουρανίου, όπως η HMP, η φουρανοδιαλδεΰδη και η φουρφουράλη. Αυτές οι ουσίες που ο σχηματισμός τους εννοείται στο όξινο περιβάλλον του μελιού τού προσδίδουν γεύση καραμέλας (Wootton et al, 1978).

1.4 ΤΟ ΧΡΩΜΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ

Το χρώμα του μελιού επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την προτίμησή του από τον καταναλωτή. Το χρώμα του μελιού ποικίλει. Έτσι μπορεί να είναι από πολύ ανοιχτόχρωμο, σχεδόν διάφανο, μέχρι πολύ σκούρο (σχεδόν μαύρο) ενώ υπάρχουν μέλια με αποχρώσεις κόκκινου, πράσινου, ακόμα και

μπλε. Έτσι ασυνήθιστο χρώμα έχουν το μέλι φλαμουριάς, σίκαλης και αυτό από είδη του γένους *Irotoea* (πρασινωπό, σχεδόν μαύρο και λευκό περλέ αντίστοιχα). Τα σκοτεινόχρωμα μέλια είναι πλουσιότερα σε θρεπτικά συστατικά και έχουν πιο έντονη γεύση ενώ τα ανοιχτόχρωμα έχουν καλύτερο άρωμα και πιο ελαφριά γεύση. Το χρώμα ποικίλει ανάλογα και με την εποχή. Για παράδειγμα, το θερινό μέλι είναι πιο ανοιχτόχρωμο συγκριτικά με το χειμερινό. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το χρώμα του μελιού είναι η υγρασία του, η κρυστάλλωση (γίνεται πιο ανοιχτόχρωμο), η διάρκεια αποθήκευσης (σκουραίνει), το φιλτράρισμα (γίνεται πιο ανοιχτόχρωμο), η διαύγαση, η έκθεση στον αέρα και η θέρμανση. Ο κύριος λόγος που το μέλι σκουραίνει οφείλεται στις αντιδράσεις Maillard που λαμβάνουν μέρος ανάμεσα στα αμινοξέα του μελιού και στα ανάγοντα σάκχαρα του (Πίκουλας, 1986).

1.5 ΤΟ ΙΞΩΔΕΣ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ

Το ιξώδες του μελιού είναι συνάρτηση του είδους και του ποσοστού των ουσιών που βρίσκονται σ' αυτό ενώ εξαρτάται και από την περιεκτικότητά του σε νερό. Μεγάλο μέρος των ιδιοτήτων αυτών εξαρτάται και από την περιεκτικότητά του σε υγρασία. Η δε θερμοκρασία επηρεάζει το ιξώδες του μέλιτος. Έτσι, με την αύξηση της θερμοκρασίας του μελιού παρατηρείται μείωση του ιξώδους. Το ιξώδες είναι μια σημαντική ιδιότητα που παίζει ρολό στην επεξεργασία του μελιού, επειδή μειώνει τη ροή του κατά τη διάρκεια της εξαγωγής, της διήθησης και της εμφιάλωσης(Πίκουλας, 1986)

1.6 Η ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ

Το μέλι είναι πυκνό διάλυμα και εξαρτάται από την περιεκτικότητά της υγρασίας ενώ τα μέλια που προέρχονται από διαφορετικά άνθη έχουν και διαφορετική πυκνότητα. Λόγω της διαφοράς στην πυκνότητα παρατηρείται κάποιες φορές ευδιάκριτη στρωματοποίηση του μελιού στα δοχεία αποθήκευσης, με το λιγότερο πυκνό μέλι να βρίσκεται πάνω από το πυκνότερο Μέλια με διαφορετική πυκνότητα δεν αναμιγνύονται εύκολα οπότε απαιτείται πολύ καλή ανάμιξη για ν' αποφευχθεί η στρωμάτωση.

1.7 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΜΕΛΙΟΥ-ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Το μέλι αποτελεί ένα φυσικό γλυκαντικό χάρη στα σάκχαρα που περιέχει και επομένως έχει μεγάλη θερμιδική αξία, ενώ αποδίδει πολύ γρήγορα ενέργεια στο σώμα (σε μόλις 15 λεπτά η γλυκόζη περνά στο αίμα). Επομένως, τονώνει τον οργανισμό σε περίπτωση κόπωσης σωματικής ή πνευματικής. Επίσης, είναι χρήσιμη ενεργειακή πηγή σε περιπτώσεις ανάπτυξης και ανάρρωσης. Έτσι, προσφέρει άμεσα ενέργεια σε παιδιά, αθλητές και εγκύους. Ενδεικτικά, 100 γραμμάρια μέλι παρέχουν 315 θερμίδες. Επειδή, το μέλι μπορεί να περιέχει σπόρους του βακτηρίου *Clostridium Botulinum* δεν θα πρέπει να δίνεται ως τροφή σε παιδιά μικρότερα των 12 μηνών, μιας και κινδυνεύουν να νοσήσουν από αλλαντίαση, μια βαριά τοξική δηλητηρίαση Υπολογίζεται ότι στις ΗΠΑ κάθε χρόνο 100 παιδιά δηλητηριάζονται από αυτό το βακτήριο κάθε χρόνο.

Το μέλι έχει αρκετές αντιμικροβιακές δράσεις *in vitro* ενώ γενικότερα οι *in vivo* δράσεις του διερευνώνται και αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το μέλι ως πρεβιοτικό, δηλ. ως ένα τρόφιμο που βοηθά στην ανάπτυξη των ευεργετικών μικροοργανισμών του εντέρου (Aly, Said et al. 2017). Το μέλι θεωρείται ότι δρα ενάντια της δυσκοιλιότητας μιας και όταν

καταναλωθεί σε σχετικά μεγάλες ποσότητες δύναται να έχει υπακτική δράση. Πειράματα σε πρωτεύοντα (*Macaca arctoides*), που έφεραν πληγές από δαγκώματα έδειξαν ότι μετά από επάλειψη των πληγών με μέλι διαπιστώθηκε ταχεία επούλωση και αποκατάσταση των νεκρωμένων ιστών (Staunton, Halliday et al. 2005). Θεραπευτική δράση ακατέργαστου μελιού έχει δειχθεί σε ασθενείς με χρόνια σμηγματορροϊκή δερματίτιδα και πιτυρίδα (Al-Waili 2001). Έχει ακόμα βρεθεί ότι το μέλι προλαμβάνει την πλάκα και την τερηδόνα, πιθανότατα λόγω της αντιβακτηριδιακής δράσης του (English, Pack et al. 2004). Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί και στην οφθαλμολογία για την αντιμετώπιση μερικών οφθαλμικών παθήσεων (Mansour 2002). Το μέλι έχει χαμηλό Γλυκαιμικό Δείκτη (55) και σε σύγκριση λοιπόν με άλλες γλυκαντικές ύλες, μπορεί να θεωρηθεί καταλληλότερο για τους διαβητικούς. Το μέλι έχει βρεθεί ότι μειώνει τη γλυκόζη αίματος σε πειραματόζωα και σε ασθενείς με μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη ή διαβήτη, αν και απαιτούνται περισσότερες κλινικές μελέτες. Η φρουκτόζη είναι ένας πιθανός αντιδιαβητικός παράγοντας, ενώ η παρουσία στο μέλι ενός ισορροπημένου μείγματος φρουκτόζης και γλυκόζης μπορεί να έχει μια πρόσθετη αντιδιαβητική δράση αφού τα δύο σάκχαρα είναι γνωστό ότι δρουν συνεργιστικά για την προώθηση του μεταβολισμού της γλυκόζης στο ήπαρ (Cornara, Biagi et al. 2017). Το μέλι έχει σημαντικές αντιοξειδωτικές δράσεις τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* λόγω των πολλών φυτοχημικών ουσιών που περιέχει (Erejuwa, Sulaiman et al. 2012) Τέλος, το μέλι έχει αντικαρκινική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (πειραματόζωα) και φαίνεται να ανακουφίζει από τις παρενέργειες της χημειοθεραπείας (Badolato, Carullo et al. 2017)

1.8 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η μέλισσα (*Apis mellifera*) έχει ιστορία μεγαλύτερη από 15 εκατομμύρια χρόνια και ο άνθρωπος προσπάθησε να την εκμεταλλευτεί από την εποχή που ήταν τροφοσυλλέκτης. Σε μια σπηλαιογραφία

στο Βισορν της Ισπανίας, ηλικίας τουλάχιστον 15.000 χρόνων, εικονίζεται ένας άνθρωπος που προσπαθεί να συλλέξει μέλι από μελίσσι ενώ σε διάφορες ζωγραφικές παραστάσεις στις Πυραμίδες της Αιγύπτου, εικονίζονται άνθρωποι που ασχολούνται με τη μελισσοκομία ενώ το μέλι αναφέρεται στην ιερογλυφική γραφή των Αιγυπτίων. Στην αρχαία Αίγυπτο, όπου υπήρχε μακρά παράδοση στη μελισσοκομία, το μέλι αποτελούσε την μοναδική γλυκαντική ύλη και προσφέρονταν ως τροφή για τα ιερά ζώα ενώ χρησιμοποιούνταν ως μονάδα υψηλής ανταλλακτικής αξίας. Στην αρχαία Ελλάδα η μελισσοκομία ήταν ιδιαίτερα ανεπτυγμένη και το μέλι ήταν απαραίτητο στοιχείο της διατροφής των κατοίκων της. Στο *Περί τα ζώα ιστορία*, ο Αριστοτέλης γνώριζε πως τα διαφορά είδη φυτών επηρέαζαν τη γεύση του μέλιτος. Στην Αρχαία Ελλάδα, το μέλι αποτελούσε τη βασικότερη γλυκαντική ουσία ενώ περίφημο ήταν το μέλι του Υμηττού. Η πρώτη κυψέλη που βρέθηκε στην Ελλάδα προέρχεται από το Ακρωτήριο της Θήρας, που καταστράφηκε από την έκρηξη του ηφαιστείου στα μέσα του 17^{ου} αιώνα π.Χ. Ο Πλίνιος ο πρεσβύτερος στο έργο του (*Naturalis Historiae*, XXI, 57) αναφέρει ότι έγιναν απόπειρες να μεταφυτευτεί Αττικό θυμάρι στην Ιταλία για την παραγωγή Αττικού μελιού. Επίσης, Βαβυλώνιοι, Σουμέριοι, Χετταίοι και Ινδοί αναφέρουν το μέλι στα κείμενά τους. Στην Παλαιά Διαθήκη η Παλαιστίνη αναφέρεται ως «η γη όπου έρρεε το γάλα και το μέλι» -Έξοδος 3:8. Στη μυθολογία των Ινδιών ο ρόλος που κατείχε η μέλισσα στον πολιτισμό τους καταδεικνύεται στο ότι ο Βίσνα συμβολίζεται με μέλισσα που αναπαύεται πάνω στον κάλυκα ενός λωτού. Οι αρχαίοι Ινδοί απέδιδαν στο μέλι πάμπολλες θεραπευτικές ιδιότητες. Μάλιστα, το πανάρχαιο βιβλίο Αγίου Βέρδα αναφέρει ότι η διατροφή με γάλα και μέλι μπορεί να παρατείνει τη ζωή του Ανθρώπου κατά 500 έτη (Μπίκος Θ, 1991).

1.9 ΕΙΔΗ ΜΕΛΙΟΥ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

1.9.1 ΜΕΛΙ ΑΝΘΕΩΝ

Οι μέλισσες συλλέγουν το νέκταρ από φυτά που ανθίζουν την άνοιξη και είναι μέλη της πλούσιας ελληνικής χλωρίδας. Προέρχεται από ένα πολύ μεγάλο αριθμό διαφορετικών φυτών και επομένως και οι ιδιότητες του διαφέρουν ανάλογα με τη βοτανική προέλευση του νέκταρος. Το μέλι ανθέων έχει προέλευση ως επί το πλείστον τις μεγάλες πεδιάδες της Θεσσαλίας, της Μακεδονίας και της Θράκης και προέρχεται από τα τριφύλλια τους ηλίανθους και τα βαμβάκια. Άλλα φυτά, από τα οποία προέρχονται τα ανθόμελα στον Ελληνικό χώρο είναι τα εσπεριδοειδή, η μέντα, η λεβάντα, η φασκομηλιά, το θρούμπι, το ρείκι, το τσάι του βουνού κ.α. Το Μέλι ανθέων παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και μαζί με το πευκόμελο υπερβαίνουν το 80% του ποσοστού της συνολικής ελληνικής παραγωγής μέλιτος. Είναι ανοιχτόχρωμο και κρυσταλλώνεται αφού περάσουν 4-6 μήνες μετά τη συλλογή του. Λόγω του ότι έχει προέλευση από έναν πολύ μεγάλο αριθμό φυτών, το μέλι ανθέων δεν έχει διακριτά στοιχεία ενώ είναι πολύ συνηθισμένο το φαινόμενο οι παραγωγοί να το αναμιγνύουν με τακτοποιημένα μέλια, όπως αυτό που προέρχεται από το βαμβάκι χωρίς **καμμία σχετικ' αναφορά** στη συσκευασία.

1.9.2 ΘΥΜΑΡΙΣΙΟ ΜΕΛΙ

Το θυμαρίσιο μέλι είναι ανθόμελο και αποτελεί μόλις το 10% της ετήσιας παραγωγής στη χώρα μας (**Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990**). Παράγεται κυρίως στα νησιά αλλά και σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα, όπου φυτρώνουν τα διάφορα είδη θυμαριού. Στη Μεσόγειο υπάρχουν 120 είδη θυμαριού, με

τα 12 από αυτά να ενδημούν στην Ελλάδα. Είναι φρύγανα που απαντώνται κυρίως σε ημιορεινές και πετρώδεις περιοχές και ανθίζουν Μάιο με Ιούνιο. Το θυμαρίσιο μέλι έχει εξαιρετικές οργανοληπτικές ιδιότητες, έχει υψηλή περιεκτικότητα σε φρουκτόζη, είναι ιδιαίτερα αρωματικό, έχει ευχάριστη γεύση και γι' αυτό είναι και το πιο διάσημο και ακριβό μέλι. Το χρώμα του είναι συνήθως ανοιχτό κεχριμπαρένιο και κρυσταλλώνει σε διάστημα 6-18 μηνών Το θυμαρίσιο μέλι που παράγεται στην Ελλάδα έχει ως πηγή προέλευσης κυρίως τα είδη *Corynodothymus capitatus*, *Thymus serpyllum* και *Satureja sp*



Εικόνα 4. Αριστερά *Corynodothymus capitatus* (κν. **Κεφαλοθύμαρο**) και δεξιά *Thymus serpyllum* (κν. Αγριοθύμαρο).

1.9.3 ΜΕΛΙ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

Από τα εσπεριδοειδή (πορτοκαλιά, λεμονιά, νεραντζιά, μανταρινιά) παράγονται σημαντικές ποσότητες μέλιτος με σημαντικότερο αυτό που προφέρεται από την πορτοκαλιά (*Citrus aurantium*). Το ανθόμελο εσπεριδοειδών παράγεται κυρίως στην Κρήτη, στην Πελοπόννησο, στη Χίο και στην Ήπειρο. Αναδίδει έντονο άρωμα και το χρώμα του είναι ανοιχτό κεχριμπαρένιο ενώ έχει ντελικάτη και ελαφρώς όξινη γεύση. Είναι αραιό και κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα ενώ δεν είναι ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990). Τα μέλια εσπεριδοειδών είναι πλούσια σε

μεταλλικά στοιχεία (Δημητριάδης, 2005) και χαρακτηρίζονται από χαμηλή συγκέντρωση προλίνης και χαμηλή διαστάση (χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό της νοθείας του μελιού).

1.9.4 ΜΕΛΙ ΗΛΙΑΝΘΟΥ

Αυτό το ανθόμελο παράγεται από το νέκταρ του *Helianthus annuus* L. Ο ηλίανθος καταλαμβάνει μεγάλες καλλιεργούμενες εκτάσεις στη χώρα μας. Η ετήσια παραγωγή μέλιτος από ηλίανθο δεν είναι σταθερή, ενώ έχει μικρή εμπορική αξία. Πρόκειται, για ανθόμελο ανοιχτού χρώματος, με υψηλό ποσοστό υγρασίας, που κρυσταλλώνει αρκετά γρηγορά (1-2 μήνες) και ανομοιόμορφα διότι περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Όταν κρυσταλλώνει παίρνει κιτρινωπό χρώμα. Τα άρωμά του λεπτό και είναι πλούσιο σε φυτοχημικές ενώσεις και ειδικότερα σε πολυφαινόλες με σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

1.9.5 ΜΕΛΙ ΒΑΜΒΑΚΙΟΥ

Το μέλι βαμβακιού ανήκει σε εκείνα τα αμιγή μέλια, που η χώρα μας παράγει σε μεγάλες ποσότητες αν και τα τελευταία χρόνια έχει μειωθεί σημαντικά η παραγωγή του λόγω των φυτοφαρμάκων. Οι εργάτριες συλλέγουν το νέκταρ του βαμβακιού (*Gossypium hirsutum* L), που καλλιεργείται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας, από τα ανθικά και εξωανθικά νεκτάρια του φυτού αλλά και από το μελίτωμα των εντόμων που παρασιτούν στο φυτό (αφίδες, αλευρώδεις κ.α.). Όταν το μέλι βαμβακιού προέρχεται από μελιτώματα έχει ανοιχτό χρώμα και όταν κρυσταλλώνει γίνεται σχεδόν άχρωμο, εν αντιθέσει με τα τυπικά μέλια μελιτωμάτων που συνήθως έχουν σκοτεινό χρώμα. Αυτό που προέρχεται από το νέκταρ του φυτού είναι επίσης ανοιχτόχρωμο και όταν κρυσταλλώνει γίνεται γαλακτόχρωμο. Το μέλι από τα μελιτώματα διακρίνεται από το ανθόμελο διότι παρουσιάζει υψηλότερη υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα ενώ είναι ιδιαίτερα φτωχό σε γυρεόκοκκους βαμβακιού. Το βαμβακόμελο

είναι ιδιαίτερα πλούσιο υπεροξειδίο του υδρογόνου και επομένως έχει την υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα άλλα είδη μελιού

1.9.6 ΜΕΛΙ ΠΕΥΚΟΥ

Τα διάφορα είδη πεύκων ευθύνονται για το 65% της συνολικής παραγωγής μέλιτος στην Ελλάδα. Το πευκόμελο έχει προέλυση τις μελιτώδεις εκκρίσεις του μελιτοφόρου εντόμου *Marchalina hellinica*, γνωστό ως «βαμβακάδα», ένα κίτρινο κροκοειδές έντομο που ανήκει στα Ημίπτερα και απομυζά την τραχεία πεύκη (*Pinus brutia*), την χαλέπιο πεύκη (*Pinus halepensis*) και σε μικρότερη κλίμακα την δασική πεύκη (*Pinus sylvestris*) και την κουκουναριά (*Pinus pinea*). Το παράσιτο απαντάται σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, όπως στη Χαλκιδική, στη Θάσο, στην Εύβοια, στη Σκιάθο, στη Ζάκυνθο, στη Ρόδο, στην Κρήτη και αλλού. Το πευκόμελο έχει χαμηλή συγκέντρωση σακχάρων γι' αυτό δεν είναι ιδιαίτερα γλυκό στη γεύση και δεν κρυσταλλώνει εύκολα όταν είναι αμιγές. Είναι παχύρευστο, έχει υψηλή συγκέντρωση τέφρας, είναι όξινο και το χρώμα του ποικίλει από ανοιχτό όταν είναι ανοιξιάτικο, έως σκούρο όταν παράγεται το φθινόπωρο. Είναι πλουσιότερο από το ανθόμελο σε ιχνοστοιχεία (ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος, χαλκός) καθώς και σε πρωτεΐνες και αμινοξέα (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

1.9.7 ΜΕΛΙ ΕΛΑΤΗΣ

Στην Ελλάδα απαντάται η ελάτη η κεφαλληνιακή (*Abies cephalonica*), δάση της οποίας βρίσκονται σε ορεινές περιοχές νότια του Ολύμπου και στην Πελοπόννησο, η ευρωπαϊκή ελάτη (*Abies alba* ή *Abies pectinata*), η οποία φύεται σε μεμονωμένα σημεία βορείως της οροσειράς του Ολύμπου ενώ στην οροσειρά της Πίνδου συναντούμε την υβριδογενή ελάτη (*Abies hidruda* ή *Abies borisii*) που είναι

διασταύρωση της ευρωπαϊκής ελάτης με την ελληνική. Τα δάση ελάτης δίνουν εξαιρετικής ποιότητας μέλι από μελιτοεκκρίσεις εντόμων τον Ιούνιο. Αυτά τα μελιτογόνα έντομα είναι δύο κοκκοειδή, τα *Physokerekes hemicryphus* και το *Eulecanium sericeum* (Lindiger) και τρεις αφίδες *Mindarus abierinus*, *Cinara confinis* και *Cinara pectinatae* (Γούναρη 2004). Το μέλι ελάτης είναι ιδιαίτερα πυκνόρρευστο σκουρόχρωμο μέλι. Υπολογίζεται ότι το 5-10% περίπου του μέλιτος που παράγεται στην Ελλάδα είναι από έλατα. Το μελι ελάτης έχει πολύ καλή γεύση και δεν κρυσταλλώνει λόγω του ότι περιέχει χαμηλό ποσοστό γλυκόζης ενώ είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (κάλιο, μαγνήσιο, σίδηρος κλπ.) (Μπίκος, 1991). Επίσης, Θεωρείται ότι παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική δράση ((Melliou and Chinou 2004). Το πυκνόρρευστο μέλι ελάτης, που παράγεται στην περιοχή Βυτίνα Αρκαδίας χαρακτηρίζεται από μεταλλικές ανταύγειες και φέρει την ονομασία «έλατο βανίλιας». Το μέλι Ελάτης Μαινάλου-Βανίλιας, έχει αναγνωριστεί ως Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (Απόφαση 313049 ΦΕΚ/Β 16.1.1994) και είναι το μοναδικό ελληνικό μέλι που έχει χαρακτηριστεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως Π.Ο.Π.

1.9.8 ΜΕΛΙ ΒΕΛΑΝΙΔΙΑΣ

Η Βελανιδιά (*Quercus macrolepis*) ή «Δέντρο» έχει εξάπλωση σε όλη την ορεινή χώρα από την Βόρεια Ελλάδα μέχρι και την Πελοπόννησο. Κατά το μήνα Ιούλιο, δίνει μελιτώδεις εκκρίσεις. Τα μελιτογόνα έντομα βελανιδιάς είναι τα *Tuberculatus annulatus* και *T.borealis*. Το μέλι βελανιδιάς είναι σκουρόχρωμο με ευχάριστη γεύση και κρυσταλλώνει δύσκολα. Είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία. Αλλά θεωρείται κατώτερο από αυτό του πεύκου και της ελάτης όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Το μέλι Αριάς (*Quercus ilex*) θεωρείται κατώτερης αξίας από αυτό της βελανιδιάς

1.9.9 ΜΕΛΙ ΚΑΣΤΑΝΙΑΣ

Η Καστανιά (*Castanea sativa*) είναι ένα αρκετά διαδεδομένο δέντρο στις ορεινές περιοχές της Ελλάδας. Η αφίδα *Myzocallis castanicola* που απομυζεί την Καστανιά παράγει μελιτώδεις εκκρίσεις τις οποίες συλλέγουν οι μέλισσες. Οι μέλισσες συλλέγουν και το νέκταρ των ανθέων της Καστανιάς. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις της *Myzocallis castanicola* αρχίζουν το Μάιο και συνεχίζονται μέχρι και τον Ιούλιο (Santas, 1983). Το μέλι καστανιάς παράγεται κυρίως στη χερσόνησο του Αγίου Όρους. Έχει έντονη πικρίζουσα γεύση με έντονο άρωμα. Ανάλογα με την προέλευση του το χρώμα του ποικίλλει από ανοιχτό καφετί μέχρι σκούρο. Η κρυστάλλωσή του γίνεται με πολύ αργό ρυθμό, είναι ανθεκτικό στη θέρμανση ενώ είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε ιχνοστοιχεία (μαγνήσιο βάριο, μαγγάνιο, κάλιο). (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990). Το καστανόμελο έχει υψηλό pH, υψηλή συγκέντρωση τέφρας και ανθίσταται περισσότερο στη ζύμωση συγκριτικά με άλλα μέλια.

1.9.10 ΜΕΛΙ ΑΚΑΚΙΑΣ

Η Ακακία (*Robinia pseudoacacia*) πρόκειται για ένα διαδεδομένο δέντρο, αυτοφυές στον Ελληνικό χώρο το οποίο χρησιμοποιείται και ως καλλωπιστικό. Στην Ελλάδα υπάρχουν πολλές ποικιλίες ακακίας και η παραγωγή αυτού του ανθόμελου είναι σχετικά μικρή. Είναι ανοιχτόχρωμο μέλι και διαυγές, έχει γλυκιά γεύση και φρουτώδες άρωμα ενώ κρυσταλλώνεται δύσκολα. Θεωρείται μέλι ανώτερης ποιότητας και υψηλής θρεπτικής αξίας.

1.9.11 ΜΕΛΙ ΚΟΥΜΑΡΙΑΣ

Η Κουμαριά (*Arbutus unedo*) είναι αειθαλής θάμνος ή μικρό δέντρο με οδοντωτά φύλλα και λευκά

άνθη, που παράγει κόκκινους εδώδιμους καρπούς. Πρόκειται για ένα ανθόμελο με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Το χρώμα του μελιού της κουμαριάς είναι σκούρο κίτρινο, έχει πικρίζουσα γεύση και μέτριο ιξώδες. Κρυσταλλώνει σχετικά γρήγορα και αποκτά βουτυρώδη υφή. Οι φυσικές αντιβιοτικές ουσίες, οι οποίες εμπεριέχονται σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλια, στο μέλι κουμαριάς προστατεύουν τον οργανισμό από διάφορες ασθένειες. Λειτουργεί ως αντισηπτικό του ουροποιητικού συστήματος, καθώς και σε περιπτώσεις ήπιων λοιμώξεων των βρόγχων. Επίσης το μέλι της κουμαριάς εμπεριέχει την ουσία Arbutin η οποία είναι υπεύθυνη για τον καθαρισμό του αίματος και την ρύθμιση των επιπέδων της χοληστερίνης σε αυτό. Επειδή, όμως, είναι τονωτικό για τα μελίσσια συνήθως δεν συλλέγεται αλλά αφήνεται στις κυψέλες ως τροφή για τις μέλισσες την περίοδο του χειμώνα.

1.9.12 ΜΕΛΙ ΦΛΑΜΟΥΡΙΑΣ

Οι Φλαμουριές (*Tilia* sp.) είναι μεγάλα φυλλοβόλα δέντρα. Το μέλι φλαμουριάς παράγεται από μελιτώματα, του εντόμου *Pulvinaria vitis* που ανήκει στην οικογένεια *Coccidae*. Το μέλι φλαμουριάς έχει γεύση σταφυλιού και θεωρείται ανώτερο από το μελί Βελανιδιάς. Η παραγωγή του είναι μικρή διότι στην Ελλάδα δεν έχουμε μεγάλες εκτάσεις με Φλαμουριές. Φύεται σποραδικά στην Κεντρική και βόρεια Ελλάδα.

1.9.13 ΜΕΛΙ ΑΓΡΩΣΤΩΔΩΝ

Τα Αγρωστώδη (*Triticum* spp.) είναι μια πολύ σπουδαία οικογένεια φυτών που περιλαμβάνει ποώδη φυτά και σπανιότερα θαμνώδη ή δενδρώδη. Στα Αγρωστώδη περιλαμβάνονται τα δημητριακά καθώς

και πολλά είδη με κτηνοτροφική αξία. Οι μέλισσες συλλέγουν τα εκκρίματα των εντόμων, κυρίως του *Cibotium avenae*, που παρασιτούν στα αγρωστώδη. Το μέλι από Αγρωστώδη είναι πολύ εύγευστο και είναι παρόμοιο με το μέλι εκκριμάτων ελάτης. Είναι πλούσιο σε πολλά είδη ατελών μυκήτων.

1.9.14 ΜΕΛΙ ΕΡΕΙΚΗΣ

Στη χώρα μας υπάρχουν τέσσερα φυτά της οικογένειας των Ερεικοδών από τα οποία παράγονται οι αντίστοιχοι τύποι ανθόμελων. Αυτά είναι η φθινοπωρινή ερείκη, (*Erica verticillata*), η ανοιξιιάτικη ερείκη (*Erica arborea*), η Κουμαριά (*Arbutus unedo*) και το Ροδόδενδρο (*Rhododendron*). Για το μέλι κουμαριάς έχουμε ήδη αναφερθεί. Από τα ερεικόμελα αυτό που παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες είναι αυτό της φθινοπωρινής ερείκης. Το ανοιξιιάτικο μέλι ερείκης είναι πιο ανοιχτόχρωμο από το φθινοπωρινό, έχει διαφορετική γεύση και χαρακτηρίζεται από υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης. Μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις η συγκέντρωση γλυκόζης κυμαίνεται υψηλότερα από την συγκέντρωση της φρουκτόζης. Το ρεικίσιο μέλι θεωρείται υψηλής θρεπτικής και διατροφικής αξίας χωρίς όμως να δεν υπάρχουν επιστημονικές μελέτες που να το τεκμηριώνουν.

1.10 ΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ

Αν και το μέλι έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες ωστόσο δεν είναι απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς. Τα περισσότερα μικρόβια και βακτήρια δεν έχουν την δυνατότητα να αναπαραχθούν στο μέλι αλλά αδρανοποιούνται λόγω της αντιβακτηριδιακής του δράσης. Έχει την ιδιότητα να εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών ή να τους θανατώνει για τους εξής λόγους:

- Η υψηλή συγκέντρωση των σακχάρων που περιέχει και η χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό προκαλεί υψηλή οσμωτική πίεση που δεν επιτρέπει την επιβίωση των περισσότερων μικροοργανισμών.
- Είναι όξινο, έχει δηλ. χαμηλό pH.
- Περιέχει υπεροξείδιο του Υδρογόνου H_2O_2 που είναι μικροβιοκτόνο αν και στο χαμηλό pH του μέλιτος (pH<5.5) η δραστηριότητά του μειώνεται σημαντικά (Iurlina and Fritz 2005)
- Έχει χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών και αμινοξέων τα οποία χρειάζονται οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν.
- Το υψηλό ιξώδες του μέλιτος δεν επιτρέπει την είσοδο του οξυγόνου άρα δεν μπορούν να αναπτυχθούν αερόβιοι μικροοργανισμοί.
- Το μέλι περιέχει αντιμικροβιακές ουσίες όπως, λυσοζύμη, defensin-1, φαινολικά οξέα, τερπένια, βενζυλική αλκοόλη και διάφορα άλλα αντιμικροβιακά πεπτίδια, όπως Jelleins 1, 2, και 4 (Brudzynski and Sjaarda 2015).

Το μέλι περιέχει κυρίως οσμοφιλικές ζύμες με τις περισσότερες να ανήκουν στα γένη Νηματοσπόρα (*Nematospora*), Σακχαρομύκητες (Yeasts), Ζυγোসακχαρομύκητες (*Zygosaccharomyces*), Σχιζοσακχαρομύκητες (*Schizosaccharomyces*) και Τορούλα (Torula). Όταν οι συνθήκες ευνοούν τον πολλαπλασιασμό τους το μέλι

υφίσταται ζύμωση και υποβαθμίζεται η ποιότητα του. Επίσης, περιέχει θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως *Bacillus spp*, *Streptococcus spp*, *Clostridium spp* και αρνητικά κατά Gram γένη βακτηρίων όπως *Klebsiella*, *Achromobacter*, *Proteus*, *E.coli*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus spp* και *Bifidobacterium spp* πολλά από τα οποία ανήκουν στο μικροβίωμα του πεπτικού συστήματος της μέλισσας . Το πιο διαδεδομένο γένος βακτηρίων που έχει εντοπισθεί σε διάφορους τύπους μελιών είναι τα το *Bacillus spp*. Επιπλέον, έχουν απομονωθεί γένη *Actinomycetes* και *Streptomyces* καθώς και νηματώδεις μύκητες, όπως *Aspergillus spp*, και *Penicillium ssp*.

Bacteria	Yeasts	Moulds
<i>Alcaligenes</i>	<i>Ascosphaera</i>	<i>Asperhillus</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Debaromyces</i>	<i>Alihia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Bettsia alvei</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Nematospora</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>E.coli</i>		
<i>Erwinia</i>	<i>Oosporidium</i>	<i>Coniothecium</i>
<i>Flavonobacterium</i>	<i>Pichia</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Peronsporocea</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Peyronelia</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Trichosporium</i>	<i>Triposporium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Torula</i>	<i>Urediancea</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Istilaginaceae</i>

Πίνακας 5. Μερικοί από τους μικροοργανισμούς που έχουν εντοπισθεί στο μέλι (Olaitan, Adeleke et al.

Ειδικά, οι ζύμες του νέκταρος προέρχονται είτε από τον φυτικό χυμό είτε από επιμόλυνση από σπόρια που μεταφέρονται στο νέκταρ μέσω του αέρα (Snowdon and Cliver 1996). Αλλά και η ίδια η μέλισσα είναι πηγή μικροοργανισμών που τους μεταφέρει στο νέκταρ. Αυτοί οι μικροοργανισμοί είτε αποτελούν μέλη της χλωρίδας του εξ σκελετού της καθώς και του πεπτικού της συστήματος είτε

βρίσκονται στην κυψέλη (Kacaniovna, Pavlicova et al. 2009). Διάφορες ζύμες, θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως *Bacillus spp*, *Streptococcus spp*, *Clostridium spp* και αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως *Klebsiella*, *Achromobacter*, *Proteus*, *E. coli* και *Pseudomonas* είναι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο μικροβίωμα της μέλισσας (Kešnerová, L., et al. 2019). Το πιο διαδεδομένο γένος βακτηριων είναι το *Bacillus spp*. ενώ έχουν, επίσης, απομονωθεί γένη *Actinomycetes* και *Streptomyces* καθώς και νηματώδεις μύκητες, όπως *Aspergillus spp*, και *Penicillium ssp*. Μάλιστα, σε μια πρόσφατη μελέτη που αφορούσε την ταυτοποίηση μικροοργανισμών μέλιτος από φυτά του γένους *Vitex* (ενδημικά της Ευρασίας), βρέθηκε πως η σύσταση του μικροβιώματος μεταβαλλόταν με την ωρίμανση του μελιού. Έτσι, ενώ στο ανώριμο μέλι κυριαρχούσαν τα γένη *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* και *Penicillium*, στο ώριμο μέλι επικρατούσαν τα γένη *Bacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Enterococcus* και *Pseudomonas* καθώς και μύκητες του γένους *Metschnikowia* (Wen, Wang et al. 2017). Η ανάλυση του μικροβιώματος έγινε με αλληλούχιση της περιοχής V3-V4 του βακτηριακού γονιδίου που κωδικοποιεί το 16rRNA.

Άλλη πηγή της μικροβιακής επιμόλυνσης του μελιού είναι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως ο αέρας και η σκόνη κατά την μεταφορά του μελιού από τις κυψέλες στο χώρο εξαγωγής του.. Επίσης, και ο μηχανολογικός εξοπλισμός, που χρησιμοποιεί ο μελισσοκόμος για την συλλογή, επεξεργασία και διατήρηση του μελιού, συμβάλλουν σημαντικά στην επιμόλυνση του μελιού με μικροοργανισμούς. Η διατήρηση του μελιού σε θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη των 20 ° C διατηρεί τα περισσότερα βακτήρια σε ληθαργική κατάσταση υπό την μορφή σπορίων. Οι ζύμες καθορίζουν την εμπορική ποιότητα του μελιού και τα σπορογόνα βακτήρια καθορίζουν την υγιεινή (κολοβακτηρίδια, σπόρια *Clostridium Botulinum*) που υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να προκαλέσουν ασθένειες στον άνθρωπο. Έχει αποδειχθεί μέσω ερευνών ότι σπόρια εμβολιάστηκαν σε μέλι και διατηρήθηκαν στους 25° C. Ο

πληθυσμός των σπορίων *Clostridium Botulinum* στη διάρκεια ενός χρόνου δεν μεταβλήθηκε στους 4 ° C. Ωστόσο, στους 65 ° C, δεν ανιχνεύθηκαν σπόρια έπειτα από 5 ημέρες αποθήκευσης. Έχει παρατηρηθεί ότι εάν το μέλι αραιώνεται με νερό, υποστηρίζει την ανάπτυξη μη παθογόνων βακτηριακών στελεχών και τη θανάτωση επικίνδυνων στελεχών (White PB, 1996). Η ποσότητα αυτών των μικροοργανισμών στο μέλι μπορεί είναι μηδενική ή μπορεί να φτάνει τις δεκάδες χιλιάδες ανά γραμμάριο μελιού, ενώ τα περισσότερα δείγματα μέλιτος περιέχουν μικρό μεν αλλά ανιχνεύσιμο αριθμό διαφόρων μικροοργανισμών. Όπως αναφέρθηκε, παρότι σε μερικά μέλια ο αριθμός των ζυμών είναι χαμηλός, αυτός μπορεί να αυξηθεί κατά πολύ όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας του μέλιτος.

Η μέτρηση του αριθμού των ζυμών είναι δείκτης της ποιότητας του μέλιτος ενώ μπορεί και να προβλέψει τη διάρκεια ζωής του. Από τα σπορογόνα βακτήρια, είδη του γένους *Bacillus*, που όπως είδαμε είναι τα πιο άφθονα στο μέλι, βρίσκονται συνήθως σε συγκέντρωση 200 CFU (colony forming units)/gr, ενώ συχνά υπάρχει και το *Clostridium botulinum* σε συγκέντρωση μόλις 1 CFU/gr. Τέλος, ένας πολύ σημαντικός δείκτης της υγιεινής του μέλιτος είναι ο προσδιορισμός των κολοβακτηριδίων που αυτό περιέχει.

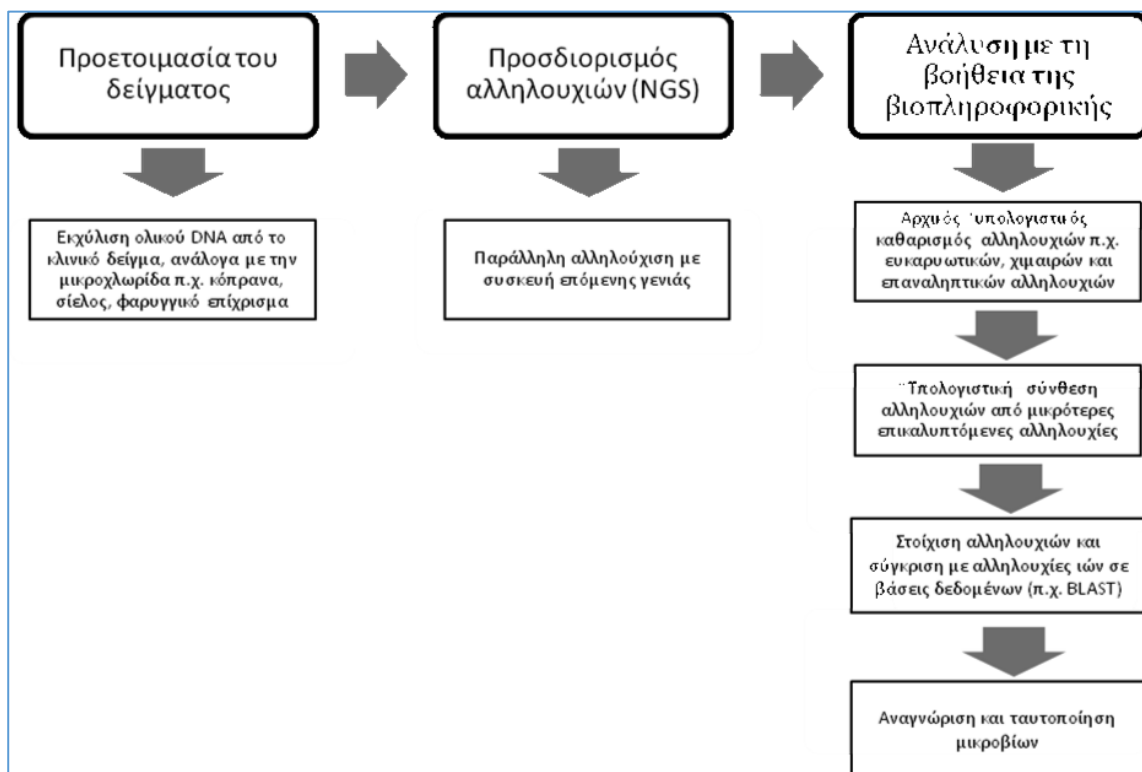
1.11. ΜΕΤΑΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΚΟΒΙΩΜΑΤΟΣ

Μέχρι σχετικά πρόσφατα η ανάλυση του μικροβιώματος γινόταν με τις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας μικροβίων. Αυτές οι μέθοδοι είναι χρονοβόρες και δεν μπορούν να τακτοποιήσουν μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε μικρούς πληθυσμούς. Η ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS) έχουν επιτρέψει την μεταγονιδιωματική ανάλυση του μικροβιώματος τροφίμων με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια (Tilocca,

Costanzo et al. 2020). Για την μεταγονιδιωματική ανάλυση βακτηρίων χρησιμοποιείται η υποομάδα 16S του ριβοσωμικού RNA (16S rRNA) των βακτηρίων. Η βασική λειτουργία του 16S rRNA, που περιέχεται στο γονιδίωμα όλων των βακτηρίων και αποτελείται από 1500 περίπου βάσεις νουκλεοτιδίων είναι η έναρξη και η επιμήκυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Αν και το γονίδιο που κωδικοποιεί το 16S rRNA είναι εξαιρετικά συντηρημένο, περιλαμβάνει εν τούτοις, εννέα μεταβλητές περιοχές που είναι διακριτές μεταξύ των διαφόρων μικροβίων. Επομένως αυτές οι περιοχές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση, την αναγνώριση και την ταξινόμηση των βακτηρίων.

Στους δε μύκητες το ριβοσωμικό DNA (rDNA) χρησιμοποιείται για τη φυλογενετική διαφοροποίηση των μυκήτων. Κωδικοποιεί μια ιδιαίτερα μεταβλητή περιοχή μεγέθους 600-800 bp, την ITS (Internal Transcribed Spacer), η οποία χρησιμοποιείται και για την ταυτοποίηση πολλών ειδών ζυμών και μυκήτων γενικότερα (Anderson & (Anderson and Cairney 2004).

Ο όρος "μεταγονιδιωματική" χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Jo Handelsman, το 1998. Το 2005, οι Kevin Chen και ο Lior Pachter (ερευνητές του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας, Berkeley) όρισαν τη μεταγονιδιωματική ως "την εφαρμογή της σύγχρονης γονιδιωματικής τεχνολογίας χωρίς την ανάγκη απομόνωσης και εργαστηριακής καλλιέργειας μεμονωμένων ειδών". Η μεταγονιδιωματική βασίζεται στην μαζική παράλληλη αλληλούχισης είτε ολόκληρου του γονιδιώματος των μικροοργανισμών ή στοχευμένων γονιδίων (π.χ. 16S rRNA, ITS) ενός δείγματος.. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται με τυχαία διάσπαση-τμηματοποίηση του DNA, αλληλούχιση των τμημάτων DNA που προκύπτουν και την χρήση κατάλληλου software ώστε να συνενωθούν οι αλληλεπικαλυπτόμενες αλληλουχιών σε μια συνεχή ακολουθία DNA η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος μικροοργανισμού.



Εικόνα 5. Στάδια μεταγονιδιωμιακής ανάλυσης μικροβιώματος(Γύπας Φ., 2014)

Το πλεονέκτημα της μεταγονιδιωμιακής ανάλυσης, σε σχέση με άλλες τεχνικές είναι η ταχύτητα και η υψηλή ευαισθησία της μεθόδου, ενώ οι περιορισμοί της είναι ότι πρέπει να γίνεται από ειδικευμένο προσωπικό στη βιοπληροφορική ανάλυση λόγω του ότι απαιτεί διαχείριση και ανάλυση του μεγάλου όγκου δεδομένων καθώς και ειδικά προγράμματα λογισμικού και επομένως απαιτεί να γίνεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάλυση του μικροβιώματος (βακτήρια, μύκητες) δειγμάτων

από δύο τύπους μελιών των περιοχών του Αγίου Όρους μέσω της τεχνολογίας Illumina miSeq PE 300.

3. Πειραματικό Μέρος

3.1 Δείγματα μελιών

Για την μεταγονιδιωματική ανάλυση, έγινε συλλογή δειγμάτων μελιού καστανιάς και κουμαριάς από το Άγιο Όρος (Πίνακας 1). Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε γυάλινα βάζα και αποθηκεύτηκαν σε σκιερό και δροσερό μέρος ενώ τους δόθηκαν κωδικοί και λεπτομέρειες για την περιοχή προέλευσής τους .

Πίνακας 2. Δείγματα μελιών

Κωδικός	Τύπος μελιού	Ημερομηνία Τρύγου	Περιοχή συγκομιδής
S3	Κουμαριά	Νοέμβριος 2018	Άγιο Όρος
S4	Καστανιά	Ιούλιος 2018	Άγιο Όρος

3.2 Υλικά

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά και εργαστηριακά μηχανήματα:

Πιπέτες

Μικροσωληνάρια τύπου Eppendorf

Falcons 50ml

Ζυγός ακριβείας

Φυγόκεντρος

Επωστήρας στους 37 °C

Υδατόλουτρο στους 65 °C

Heat block στους 80°C

Γυάλινα σφαιρίδια

Φίλτρα 0,45μm

3.3 Μέθοδοι

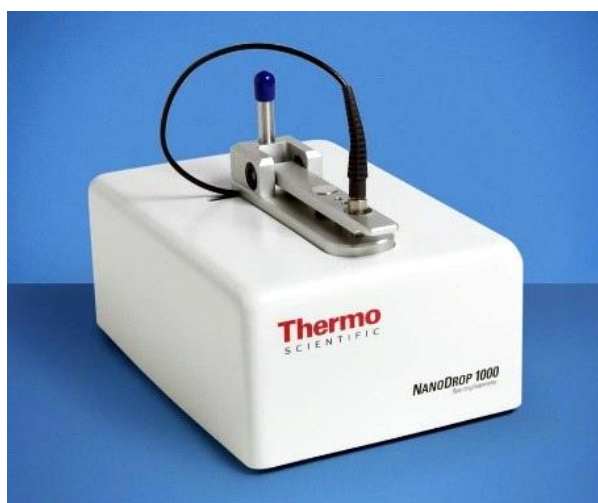
3.3.1 Απομόνωση ολικού DNA από τα δείγματα μελιού με το πρωτόκολλο Wizard της Promega

Η απομόνωση έγινε όπως έχει περιγραφεί με κάποιες, όμως, τροποποιήσεις (Soares, Amaral et al. 2014). Η προεπεξεργασία των δειγμάτων και η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο Wizard το οποίο σύμφωνα με προηγούμενη έρευνα αποδείχθηκε ότι λειτουργεί αποτελεσματικότερα από τα υπόλοιπα πρωτόκολλα. (Ελένη Χαραλάμπους, 2019)

Για την προεπεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία: 50 gr από κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε 4 falcon των 50 ml, δηλαδή 12,5gr μέλιτος σε κάθε falcon. Έπειτα, τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40°C για 10 λεπτά. Ακολούθως τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 9000g για 10 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 5 ml ddH₂O και το περιεχόμενο των 4 falcon ενώθηκε σε ένα. Στη συνέχεια, το διάλυμα αραιώθηκε στα 45 ml με ddH₂O και φυγοκεντρήθηκε στις 9000 στροφές για 10 λεπτά. Έπειτα, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml ddH₂O. Στο διάλυμα έγινε προσθήκη 20 γυάλινων σφαιριδίων μεγέθους 400μm και ανακινήθηκε για 2 λεπτά. Τέλος, τα σφαιρίδια αφαιρέθηκαν και το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -20 °C μέχρι να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση του DNA.

3.3.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των προϊόντων των εκχυλίσεων DNA με Nanodrop

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA που απομονώθηκε από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Nanodrop (τμήμα Ιατρικής, εργαστήριο Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας), το οποίο έχει την ικανότητα να μετρά με μεγάλη ακρίβεια τη συγκέντρωση DNA σε δείγματα όγκου μόλις 1μl (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Η συσκευή Nanodrop και τα βήματα της χρήσης της: α) Βραχίονας που φέρει τις ακίδες μέτρησης, β) Άνω και κάτω ακίδα μέτρησης, γ) Το δείγμα τοποθετείται στην κάτω ακίδα, Δ) μέτρηση και καθαρισμός της άνω και κάτω ακίδας (NanoDrop Technologies, Inc., 2007).

3.3 Βιοπληροφορική ανάλυση:

Για την ανάλυση του μικροβιώματος, χρησιμοποιήσαμε τα fastq αρχεία όπως λήφθηκαν από την ιστοσελίδα της Macrogen Co., τόσο για το forward read όσο και το reverse και όλη η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό Qiime2.

Αρχικά χρησιμοποιήσαμε τον αλγόριθμο DADA από το συγκεκριμένο λογισμικό για να γίνει αφαίρεση του θορύβου και να φιλτραριστούν τα χειμερινά μόρια. Στο συγκεκριμένο στάδιο στα βακτήρια τα reads από τα βακτηριακά fastq αρχεία κόπηκαν σε μέγεθος 290nt και 220nt για το forward και το reverse αντίστοιχα, σε αντίθεση με τους μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία κοπής τα μήκη 240nt και 180nt αντίστοιχα, κι έπειτα από τα προαναφερθέντα μήκη τα read ήταν “κακής ποιότητας”.

Για το φιλτράρισμα των χειμερινών μορίων χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της συναίνεσης (consensus). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες γνωστές αλληλουχίες από τις βάσεις δεδομένων SILVA (για το 16S rRNA) και τη βάση δεδομένων UNITE (ITS αλληλουχίες) σαν σημείο αναφοράς για να βρεθεί η ταξινόμηση των οργανισμών που περιλάμβανε το κάθε δείγμα. Οι αλληλουχίες που συναρμολογήθηκαν για τα διάφορα δείγματα εξετάστηκαν μέσω του αλγορίθμου vsearch έναντι των γνωστών αλληλουχιών ώστε να βρούμε την ταξινόμησή τους. Μέσω των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν τα ραβδογραφήματα (bar-plots).

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

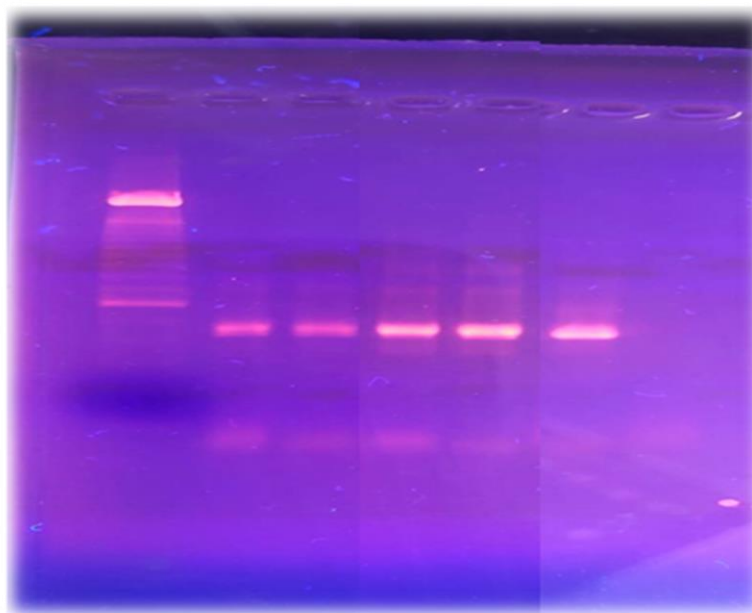
4.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης προϊόντων των εκχυλίσεων DNA με Nanodrop

Μετά την εκχύλιση του DNA με την μέθοδο Wizard η οποία όπως είχε αποδειχθεί από προηγούμενη έρευνα (Ελένη Χαραλάμπους 2019) λειτούργησε αποτελεσματικότερα από τις υπόλοιπες μεθόδους, έγινε ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων του ολικού DNA που απομονώθηκε από το δείγμα καστανιάς και κουμαριάς αντίστοιχα με την βοήθεια του Nanodrop. Τα αποτελέσματα ολικού DNA για το δείγμα μελιού της κουμαριάς S3 ήταν 6.8(ng/μl) και για το δείγμα καστανιάς S4 42,6(ng/μl).

4.2 Αποτελέσματα ποιοτικού ελέγχου ολικού DNA μέσω ενίσχυσης των V3-V4 περιοχών του 16S rRNA

Το DNA ελέγχθηκε για την ακεραιότητα του δηλαδή την περίπτωση να έχει υποστεί αποικοδόμηση και διαπιστώθηκε αν μπορεί να ενισχυθεί το DNA των βακτηρίων με κατάλληλους εκκινητές. (ποιοτικός έλεγχος)

Έπειτα τα 10μl από τα προϊόντα της PCR έτρεξαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και τα αποτελέσματα έγιναν ορατά σε φως UV. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 7 . Μέλια από Κουμαριά (S3) και Καστανιά (S4): Ηλεκτροφόρηση πήκτης αγαρόζης από προϊόντα της PCR από την ενίσχυση της περιοχής V3-V4 του 16S ριβοσωμικού RNA των εκχυλίσεων DNA που προετοιμάστηκαν με την μέθοδο Wizard) Με σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: ladder 100 βάσεων, S3(1μl), S3(2μl), S4(1μl), S4(2μl), Θετικός μάρτυρας, Αρνητικός μάρτυρας

4.2 Αποτελέσματα μεταγονιδιωμιατικής ανάλυσης

Δείγματα S3 κουμαριάς και S4 καστανιάς

Όλη η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό Qiime2 (ο αριθμός των reads στην αρχή για κάθε αρχείο φαίνεται στον πίνακα 3).

	Bacteria	Fungi
Κουμαριά	215033	129857
Καστανιά	168947	189956

Πίνακας 3. Τα reads που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα S3 και S4 (βακτήρια και μύκητες)

Τα αποτελέσματα της μικροβιακής ποικιλότητας σε βακτήρια και μύκητες για τα δείγματα μελιών καστανιάς και κουμαριάς αντίστοιχα φαίνονται στις παρακάτω εικόνες. Οι κυρίαρχες ομάδες βακτηρίων σε ποσοστό επί τοις εκατό και στα 2 δείγματα κουμαριάς και καστανιάς είναι οι (*Lactobacillus* AVG (μέσος όρος):31%) και (*Sphingomonas* AVG (μέσος όρος):24%), ενώ οι κυρίαρχες ομάδες μυκήτων είναι οι (*Zygosaccharomyces* AVG (μέσος όρος) :20.1%),(*Capnodiales* AVG (μέσος όρος:18.1%) και (*Wickerhamomyces* AVG (μέσος όρος):13.1%).

Πιο συγκεκριμένα οι ομάδες βακτηρίων που κυριαρχούν στο μέλι της κουμαριάς είναι οι *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter* με ποσοστά 42, 31 και 6,7%. Όσον αφορά το μέλι της καστανιάς τα ποσοστά για τις ίδιες ομάδες βακτηρίων είναι 7, 51 και 4% αντίστοιχα. Σχετικά με τις ομάδες μυκήτων οι κυρίαρχες για το μέλι της κουμαριάς είναι οι *Zygosaccharomyces*, *Unassigned* (μύκητες που δεν μπορούν να ταξινομηθούν), *Capnodiales*, *Sacchoromycotales* και *Wickerhamomyces* με ποσοστά 38,12,25,9,24% αντίστοιχως. Ενώ οι ίδιες ομάδες μυκήτων για το μέλι της καστανιάς περιέχονται σε ποσοστά 2, 11, 16,6, 3%.

Σχετικά με το βακτηριακό μικροβίωμα του δείγματος ελάτου που μελετήθηκε σε προηγούμενη έρευνα ([Ελένη Χαραλάμπους 2019](#)) οι ομάδες βακτηρίων που κυριαρχούν είναι οι *Lactobacillus spp*, *Sphingomonas spp*, *Bacillus spp*, *Pseudomonas* και *Acetobacter* με ποσοστά 82, 5, 1, 1, 1% αντίστοιχα. Ενώ στους μύκητες, κυριαρχούν οι φυλότυποι *Candida*, *Dothideales*, *Wickerhamomyces* και *Zygosaccharomyces mellis* με ποσοστά 18, 12, 10 και 9% αντίστοιχα. Οι διαφορές συγκριτικά με τα δείγματα μελιού κουμαριάς και καστανιάς που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική είναι ότι στις ομάδες των βακτηρίων οι λακτοβάκιλλοι βρίσκονται σε μικρότερο ποσοστό 31% και στα 2 είδη μελιού, με 51% σχετική αφθονία στο μέλι καστανιάς και 11% στο μέλι κουμαριάς, ενώ στο μέλι ελάτου περιέχονται σε σχετική αφθονία 82%. Όσον αφορά τους μύκητες στο μέλι ελάτου κυριαρχούν σε ποσοστό 18% οι φυλότυποι *Candida* ενώ στα μέλια κουμαριάς το ποσοστό είναι μικρότερο από

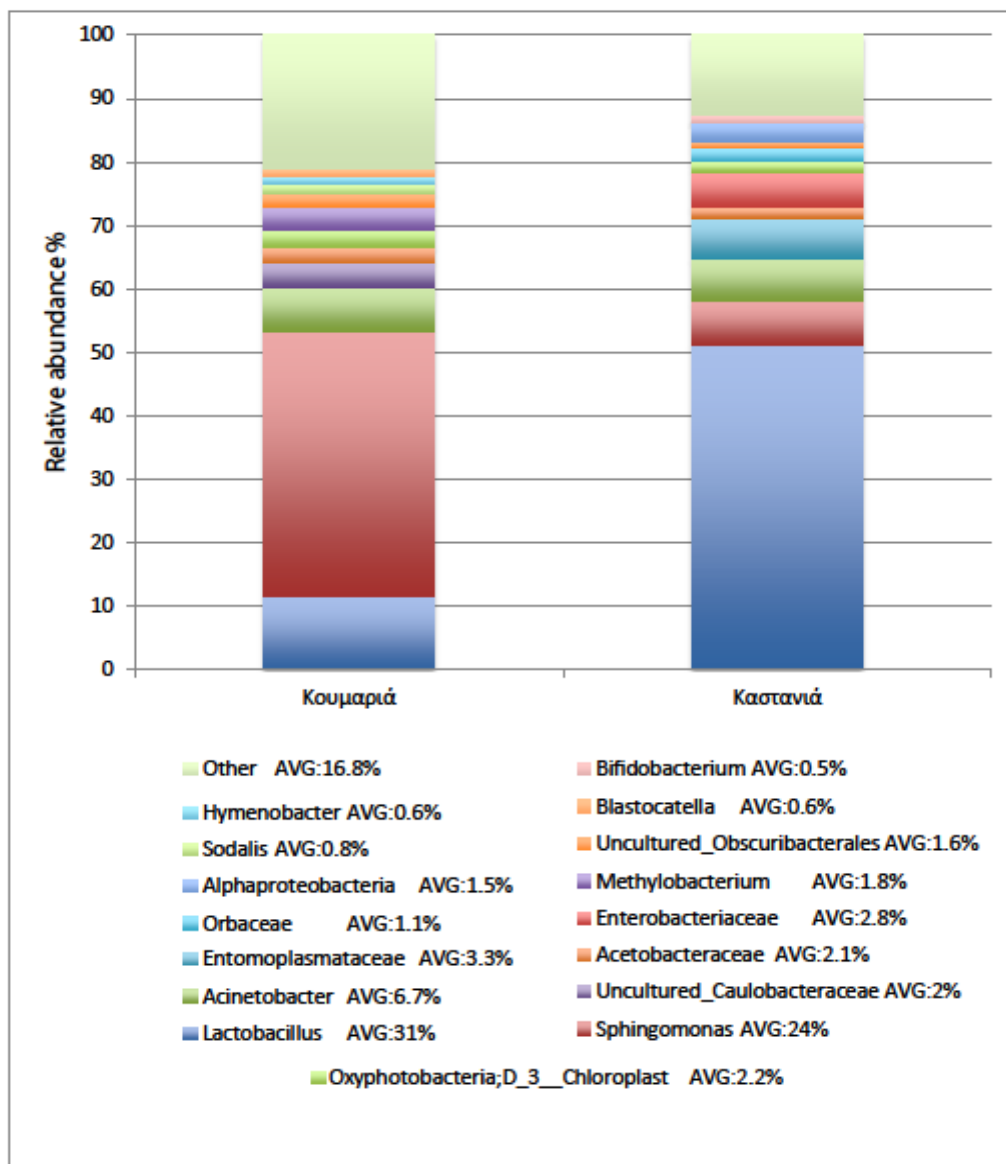
1%. Σε αντίθεση με την ομάδα *Zygosaccharomyces* που κυριαρχεί στα μέλια καστανιάς και κουμαριάς με μέσο όρο 20,1%, στο μέλι ελάτου το ποσοστό των συγκεκριμένων μυκήτων είναι 1%.

Συγκριτικά με το μέλι *Vitex* το οποίο παράγεται στην Κίνα τα επικρατή βακτήρια είναι τα είδη *Bacillus spp*, *Lactococcus spp*, *Oceanbacillus*, *Enterococcus* και *Pseudomonas* σε ποσοστά 67 , 11 ,4, 4 και 1% , αντίστοιχα. Η πιο σημαντική διαφορά φαίνεται να είναι στα ποσοστά του *Lactobacillus spp*, όπου στο μέλι ελάτου βρίσκεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 82% όπως και στο μέλι καστανιάς και κουμαριάς σε ποσοστό 31%. Στο μέλι *Vitex* το ποσοστό της συγκεκριμένης ομάδας βακτηρίων βρίσκεται σε ποσοστό μικρότερο του 1%.

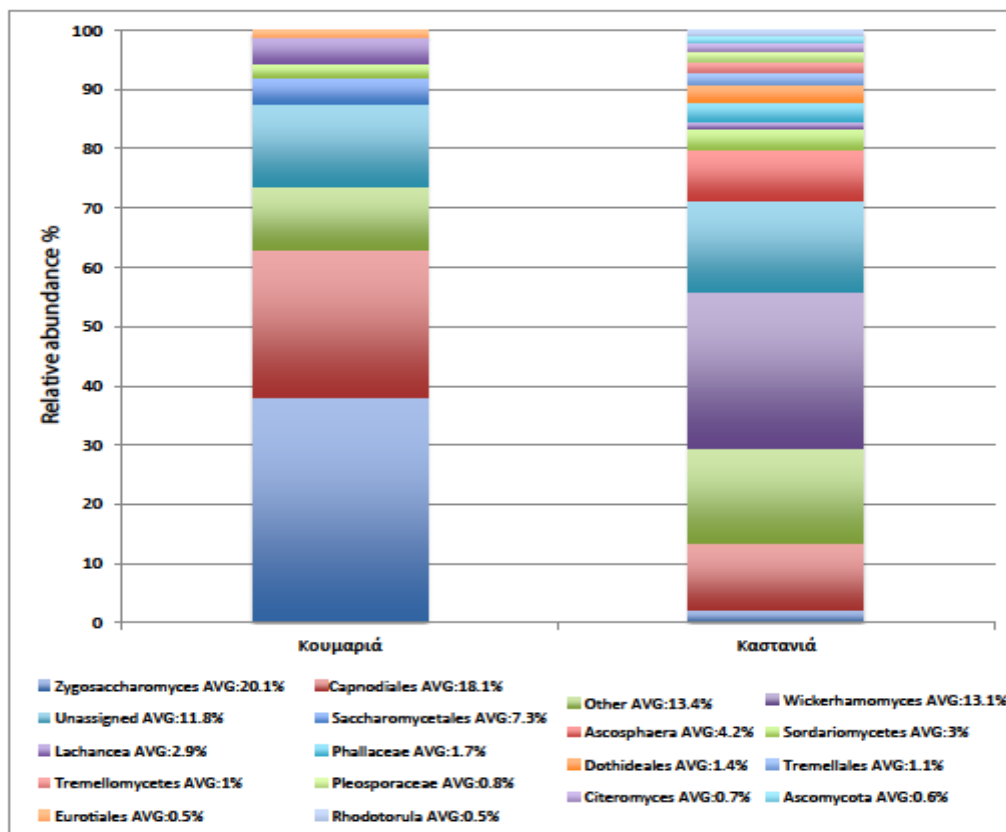
Επιπλέον, οι ομάδες των μυκήτων που επικρατούν στο μέλι *Vitex* είναι οι φιλότηποι *Metschokowia* , *Aurobasidium* , *Phoma* , *Candida* και *Cladosporium* με ποσοστά 96, 4 , 3 , 2 και 1%, αντίστοιχα. Ενώ η ομάδα μυκήτων *Zygosaccharomyces* κυριαρχεί στο μέλι καστανιάς και κουμαριάς σε ποσοστό 20,1%.

Η μεταγονιδιατική ανάλυση του μελιού *Vitex* έγινε σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (5 ημερών ,10 ημερών και 15 ημερών) όπου παρατηρήθηκε μείωση στα ποσοστά των μυκήτων στο πέρασμα των ημερών).

Γενικά το μικροβίωμα στο μέλι δημιουργείται από ποικίλους παράγοντες. Τα είδη, *Bacillus spp* , *Lactobacillus*, *Enterococcus spp* και *Pseudomonas* βρίσκονται στην πεπτική οδό της μέλισσας. Τα είδη, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* και *Oceanbacillus* υπάρχουν στα λουλούδια και το περιβάλλον. Ενώ οι ζύμες-μύκητες που κατορθώνουν να επιβιώσουν σε ένα υψηλά ωσμωτικά περιβάλλον δημιουργούνται είτε από το περιβάλλον, είτε από ανθρώπινους χειρισμούς.



Εικόνα 8: Σχετική αφθονία βακτηρίων στα δείγματα μελιών καστανιάς και κουμαριάς αντίστοιχα.



Εικόνα 9: σχετική αφθονία μυκήτων στα δείγματα μελιού καστανιάς και κουμαριάς αντίστοιχα

Συζήτηση:

Το μέλι είναι γνωστό για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, παρόλα αυτά δεν είναι στείρο από μικροοργανισμούς (βακτήρια και μύκητες). Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού DNA σε δύο δείγματα μελιών καστανιάς και κουμαριάς, μέσω της μεθόδου Wizard μαζί με την πρώτη ομογενοποίηση, η οποία έχει αποδειχθεί από προηγούμενη έρευνα (Ελένη Χαραλάμπους 2019) ότι λειτουργεί αποτελεσματικότερα. Η συγκέντρωση του ολικού DNA μετρήθηκε μέσω Nanodrop και πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος με την ενίσχυση των περιοχών V3 – V4 του 16S rRNA. Στη συνέχεια το DNA των δειγμάτων μελιού απεστάλησαν στην εταιρεία MacroGen Inc για να γίνει η μεταγονιδιωματική ανάλυση μέσω αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) με τη χρήση του Illumina MiSeq PE300.

Η πιο σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε από τα αποτελέσματα της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης είναι ότι τόσο στο μέλι ελάτου όσο και στα δείγματα μελιού καστανιάς και κουμαριάς τα ποσοστά του γένους *Lactobacillus* βρίσκονται σε υψηλά ποσοστά, 82% για το μέλι ελάτου και μέσο όρο 31% για τα μέλια καστανιάς και κουμαριάς. Σε αντίθεση με το μέλι Vitex στην Κίνα το γένος *Lactobacillus* περιέχεται σε πολύ χαμηλό ποσοστό μικρότερο του 1%. Η αυξημένη παρουσία λακτοβάκιλων στο μικροβίωμα του μελιού από έλατο, καθώς και της καστανιάς και κουμαριάς προέρχεται από τον γαστρεντερικό σωλήνα της μέλισσας εφόσον είναι γνωστό ότι ανήκουν στο μικροβίωμα της. Η ανάλυση περισσότερων και διαφορετικών τύπων μελιού ελληνικής προέλευσης θα ήταν χρήσιμη ώστε να γίνει σύγκριση τόσο μεταξύ δειγμάτων μελιού ελληνικής προέλευσης όσο και σύγκρισή τους με τύπους μελιών που προέρχονται από το ξένες χώρες. Η διαφορά των μελιών καστανιάς και κουμαριάς που αφορά την αυξημένη παρουσία του γένους *Lactobacillus* συγκριτικά με το μέλι Vitex στο οποίο το ποσοστό είναι πολύ χαμηλό, είναι πιθανόν να οφείλεται στα διαφορετικά είδη μελισσών οι οποίες παράγουν το μέλι. Κατ' επέκταση η υψηλή παρουσία λακτοβάκιλων μπορεί να αποτελέσει έναν βιοδείκτη για την ανίχνευση της προέλευσης των δειγμάτων μελιού.

Οι λακτοβάκιλλοι, αποτελούν θετικά κατά Gram βακτήρια, μη σπορογόνα. Έχουν την δυνατότητα να επιβιώνουν σε συνθήκες πεπτικού συστήματος (χαμηλό pH) γι' αυτό και βρίσκονται και στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα, αποτρέποντας την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, που θεωρείται η βασική τους λειτουργία. Επιπλέον διαθέτουν θεραπευτικές ιδιότητες ως προβιοτικά ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα. Απαιτούνται βέβαια επιπλέον κλινικές μελέτες μέσω απομόνωσης ώστε να διαπιστωθεί η λειτουργία των λακτοβάκιλλων ως προβιοτικά στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αλυσσανδράκης, Ε. (2007). Διαφοροποίηση αμιγών ελληνικών μελιών πορτοκαλιάς, θυμαριού και βαμβακιού με βάση τα πτητικά συστατικά τους. Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γούναρη, Σ. (2004). Η ωφελιμότητα των προϊόντων της μέλισσας στον άνθρωπο. Πρακτικά του 2ο Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα 21-23 Μαΐου 2004, σελ. 29-36.

Φ. Γύπας, Α.-Φ. Α. Μεντής (2014). Τεχνικές μελέτης των φυσιολογικών μικροχλωρίδων του ανθρώπου - Μεταγονιδιωματική. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής εταιρείας τομος 59 τευχος 2

Δημητριάδης Κ. (2005). Μελίαμα. Περιοδική έκδοση επιστημονικού κέντρου μελισσοθεραπείας. Τεύχος 3. Φθινόπωρο-Χειμώνας 2005-2006. Σελ 14.

Θρασυβούλου, Α., Μανίκης, Ι., Τανανάκη, Χ., Τσέλλιος, Δ., Καραμπουρνιώτη, Σ. και Δήμου, Μ. (2002). Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού Α. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος. Πρακτικά του 1ο Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002, σελ. 232-253.

Καραμπουρνιώτη, Σ. (2002). Προσδιορισμός της νοθείας με εισαγόμενα μέλια μέσω της γυρεολογικής ανάλυσης. Πρακτικά του 1ο Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002, σελ. 327-332.

Μπίκος Θ. (1991) Όλα για το μέλι. Έκδοση του ιδίου. σελ. 263-270

Θρασυβούλου Α. και Μανίκης Ι.(1990) Κατηγορίες Ελληνικού μελιού
Μελισσοκομική Επιθεώρηση 4 (6): 158-160.

Πίκουλας Ε. Τεχνολογία γλυκαντικών υλών. 1986 Α

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aly, H., et al. (2017). "Medically Graded Honey Supplementation Formula to Preterm Infants as a Prebiotic: A Randomized Controlled Trial." J Pediatr Gastroenterol Nutr 64(6): 966-970.

Al-Waili, N. S. (2001). "Therapeutic and prophylactic effects of crude honey on chronic seborrheic dermatitis and dandruff." Eur J Med Res 6(7): 306-308.

Anderson, I. C. and J. W. Cairney (2004). "Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques." Environ Microbiol 6(8): 769-779.

Crane, E., (1990). The traditional hive products: honey and beeswax, Chapter 13, pp: 388-451. In: *Bees and Beekeeping* (Ed. By E. Crane).

Badolato, M., et al. (2017). "From the hive: Honey, a novel weapon against cancer." Eur J Med Chem 142: 290-299.

Brudzynski, K. and C. Sjaarda (2015). "Honey glycoproteins containing antimicrobial peptides, Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, are responsible for the cell wall lytic and bactericidal activities of honey." PLoS One 10(4): e0120238.

Cornara, L., et al. (2017). "Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products." Front Pharmacol 8: 412.

Edgar, J. A., et al. (2002). "Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: a potential threat to health." J Agric Food Chem 50(10): 2719-2730.

English, H. K., et al. (2004). "The effects of manuka honey on plaque and gingivitis: a pilot study." J Int Acad Periodontol 6(2): 63-67.

Erejuwa, O. O., et al. (2012). "Honey: a novel antioxidant." Molecules 17(4): 4400-4423.

Iurlina, M. O. and R. Fritz (2005). "Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources." Int J Food Microbiol 105(3): 297-304.

Kacaniova, M., et al. (2009). "Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia." Acta Microbiol Immunol Hung 56(3): 285-295.

Kešnerová, L., et al. (2019). "Gut microbiota structure differs between honey bees in winter and summer." bioRxiv: 703512.

Lothrop, R. E. and Paine, H. S. (1931). Some properties of honey colloids and the removal of colloids from honey with bentonite. *Industrial and Engineering Chemistry*, 23: 328-332.

Mansour, A. M. (2002). "Epithelial corneal oedema treated with honey." Clin Exp Ophthalmol 30(2): 149-150.

Melliou, E. and I. Chinou (2004). "Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis." Planta Med 70(6): 515-519.

Olaitan, P. B., et al. (2007). "Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes." Afr Health Sci 7(3): 159-165.

Snowdon, J. A. and D. O. Cliver (1996). "Microorganisms in honey." Int J Food Microbiol 31(1-3): 1-26

Soares S, Amaral J.S , Mafra I et al, Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification, *Food Control*, 2015, 130-136

Staunton, C. J., et al. (2005). "The use of honey as a topical dressing to treat a large, devitalized wound in a stump-tail macaque (*Macaca arctoides*)." Contemp Top Lab Anim Sci 44(4): 43-4

Tilocca, B., et al. (2020). "Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production." J Proteomics 210: 103534.

Tomas-Barberan, F. A., et al. (2001). "HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums." J Agric Food Chem 49(10): 4748-4760.

Wen, Y., et al. (2017). "The Microbial Community Dynamics during the Vitex Honey Ripening Process in the Honeycomb." Front Microbiol 8: 1649.

367.

Wootton, M., Edwards, R. A., Faraji-Haremi, R. and Williams, P. J. (1978). Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honeys. III. Changes in volatile components. *Journal of Apicultural Research*, 17:167

