

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**



«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Δάμτσιας Θεοφάνης

«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΜΕΛΙΑ ΤΟΥ ΟΛΥΜΠΟΥ»



Λάρισα, 2016

Ανίχνευση αντιμικροβιακών ουσιών σε μέλια του Ολύμπου

Detection of antimicrobial substances in honeys from the Olympus

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

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

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

Αμούτζιας Γρηγόρης: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πρόλογος- Ευχαριστίες

Το εφελτήριο για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας στο συγκεκριμένο θέμα το έδωσε ο επίκουρος καθηγητής Δ. Μόσιαλος τον οποίο ευχαριστώ θερμά, καθώς και το οφείλω την εκπαιδευτική μου κατάρτιση πάνω σε θέματα μικροβιολογίας. Επίσης, τον ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία, τις υποδείξεις και την παρότρυνση για επίλυση όλων των αποριών μου και φυσικά για την ουσιαστική του βοήθεια στη διόρθωση και συμπλήρωση της εργασίας, χωρίς την οποία δεν θα κατάφερνα την ολοκλήρωσή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Βακτηριολογίας - Ιολογίας Τηλέμαχο Δημητρίου για την καθοδήγηση και βοήθεια μέσα στο εργαστήριο, καθώς και όλους τους συναδέλφους για την άριστη συνεργασία και το φιλικό κλίμα που δημιούργησαν.

2016

Δάμτσιας Θεοφάνης

Περίληψη

Η αυξανόμενη τα τελευταία χρόνια ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που εμφανίζουν πολλά στελέχη βακτηρίων προκαλεί ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα και έχει οδηγήσει στην προσπάθεια ανάπτυξης εναλλακτικών σκευασμάτων με σκοπό την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών.

Το μελί είναι ένα λειτουργικό σκεύασμα, που αποτελείται από ένα μίγμα πολλών συστατικών και εμφανίζει άριστες αντιμικροβιακές ικανότητες. Τα συστατικά του μελιού, που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα είναι πολλά, με κυριότερο το ενδογενές υπεροξειδίο του υδρογόνου το οποίο παρατηρείται στα περισσότερα ελληνικά μέλια από την περιοχή του Ολύμπου και την μέθυλ-γλυοξάλη η οποία απαντάται σε μεγάλες ποσότητες σε μέλια προερχόμενα από το φυτό *Leptospermum scoparium* όπως το μελί Manuka.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 21 δείγματα μελιών από την ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου *in vitro*, ως προς την συγκέντρωση του ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου και της μέθυλ-γλυοξάλης που περιέχουν. Προσδιορίστηκε και ποσοτικοποιήθηκε του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται στα μέλια αυτά, καθώς επίσης έγινε προσπάθεια για βελτιστοποίηση των συνθηκών στις οποίες παρατηρείται μεγίστη παραγωγή υπεροξειδίου, όπως η αραιώση του μελιού, ο χρόνος επώασης των αραιώσεων και η διαφορετική θερμοκρασία επώασης, είτε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είτε στους 37°C.

Τα ελληνικά μέλια παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και διαπιστώθηκε ότι σε 2 από αυτά η συγκέντρωση του υπεροξειδίου κυμάνθηκε σε πολύ υψηλά επίπεδα. Επίσης αποδείχτηκε ότι η αραιώση σε νερό σε λόγο 1:10, και η επώαση στους 37°C μέχρι τρεις ώρες είναι οι ιδανικές συνθήκες, ώστε να επιτευχθεί η μεγίστη παραγωγή της αντιμικροβιακής αυτής ουσίας.

Επιπρόσθετα, μετρήθηκε η συγκέντρωση της αντιμικροβιακής ουσίας μέθυλ-γλυοξάλης στο μελί Manuka και σε μέλια από την περιοχή του Ολύμπου και για το Manuka επιβεβαιώθηκε η συγκέντρωση που προβλέπεται από τον παρασκευαστή του μελιού, ενώ στα τα ελληνικά μέλια δεν βρέθηκαν ποσότητες μέθυλ-γλυοξάλης.

Συμπερασματικά, τα μέλια που εξετάστηκαν εμφανίζουν ικανοποιητικές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου αντίστοιχες με αυτές που εμφανίζουν πολλά αναγνωρισμένα μέλια, γεγονός που καθιστά τα μέλια αυτά ιδανικούς υποψηφίους για τη χρήση τους, τόσο ως αντιμικροβιακά σκευάσματα όσο και ως λειτουργικά τρόφιμα.

Abstract

In recent years many pathogenic microorganisms have obtained multidrug resistance, which is causing a great concern in the scientific community and it has led many scientists to concentrate their efforts to develop alternative formulations to combat pathogens.

Honey is a functional composition, comprising a mixture of many components, and exhibits excellent antimicrobial capabilities. The ingredients of honey, which exhibit antimicrobial activity are many, the main being endogenous hydrogen peroxide which is observed in many honeys from the Olympus and methylglyoxal that is found in large quantities in honeys derived from *Leptospermum scoparium* plant such as Manuka honey.

The present study examined 21 samples of honey from the region of Olympus in vitro, regarding the concentration of endogenous hydrogen peroxide and methylglyoxal. Determination and quantification of the production of hydrogen peroxide in these honeys was achieved, as well as there were optimized the conditions in which there is a maximum peroxide production, such as honey dilution ratio, incubation time of the solutions and different incubation temperature, either at ambient temperature or at 37°C.

The Greek honeys showed encouraging results regarding the production of hydrogen peroxide and it was found that in two of them the concentration of peroxide ranged in very high levels. Moreover, was proved that the dilution in water at ratio of 1:10, and incubation at 37°C for up to three hours are the ideal conditions to achieve maximal production of this antimicrobial substance.

In addition, we have measured the concentration of the antimicrobial agent methylglyoxal in Manuka honey and honey samples from Olympus. Manuka honey has been demonstrated the concentration provided by the manufacturer, while Greek honeys did not exhibit traceable quantities of methyl-glyoxal.

In conclusion, some tested honeys have been demonstrated high hydrogen peroxide concentrations thus making Greek honeys ideal candidates for their use, such as antimicrobial agents as well as functional foods.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελ.
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Το μέλι	9
1.1 Σύσταση του μελιού	11
1.2 Οι αντιμικροβιακές - αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού	12
1.3 Μέλι Manuka και άλλα είδη μελιών	20
1.4 Ενζυμα του μελιού	22
1.5 Σκοπός της μελέτης	26
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2. Υλικά και Μέθοδοι	27
2.1 Υλικά	27
2.1.1 Δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου	27
2.1.2 Μέλι Manuka	30
2.1.3 Αντιδραστήρια	30
2.1.4 Όργανα και αναλώσιμα	31
2.2 Μέθοδοι	32
2.2.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μέλι	32
2.2.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της μέθυλ-γλυοξάλης στο μέλι	32
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Αποτελέσματα προσδιορισμού της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα ελληνικά μέλια	33
3.2 Αποτελέσματα του προσδιορισμού της μέθυλ-γλυοξάλης στα ελληνικά μέλια	43
IV. Συμπεράσματα – Συζήτηση	44
V. Βιβλιογραφία	47

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	Σελ.
Πινάκας 2.1 Χαρακτηριστικά Δειγμάτων μελιών του Ολύμπου	29
Διάγραμμα 3.1.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δειγμάτων υπεροξειδίου του υδρογόνου	33
Διάγραμμα 3.1.2 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διαφορετικές αραιώσεις σε νερό για το μέλι 2	34
Διάγραμμα 3.1.3 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διαφορετικές αραιώσεις σε νερό για το μέλι 6	34
Διάγραμμα 3.1.4 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διαφορετικές θερμοκρασίες για το μέλι 5	35
Διάγραμμα 3.1.5 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διαφορετικές θερμοκρασίες για το μέλι 11	35
Πινάκας 3.1.1 Μέγιστη συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) στα δείγματα μελιών	37
Πινάκας 3.1.2 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διάφορα χρονικά διαστήματα επώασης στους 37° C, για τα δείγματα 1,2,5,6,11	39
Διάγραμμα 3.1.6 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 1	39
Διάγραμμα 3.1.7 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 2	40
Διάγραμμα 3.1.8 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 5	40
Διάγραμμα 3.1.9 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 6	41
Διάγραμμα 3.1.10 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 11	41
Διάγραμμα 3.2.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δειγμάτων μέθυλ-γλυοξάλης	43

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Το μέλι

Το μέλι είναι μια ουσία που παράγεται από την *Apis mellifera* (Ευρωπαϊκή μέλισσα), αποτελεί ένα από τα πιο παλιά παραδοσιακά φάρμακα και συγκαταλέγεται μέσα στα πιο σημαντικά σκευάσματα για τη θεραπεία διάφορων ανθρώπινων ασθενειών. Στους περισσότερους αρχαίους πολιτισμούς το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί τόσο για διατροφικούς όσο και για θεραπευτικούς λόγους. Η ιδέα ότι το μέλι αποτελεί σημαντικό τρόφιμο και φάρμακο έχει διατηρηθεί μέχρι



σήμερα και γι' αυτό τελευταία έχει αναπτυχθεί ένας εναλλακτικός κλάδος ιατρικής, που ονομάζεται μελισσοθεραπεία, προσφέροντας θεραπείες με βάση το μέλι και αλλά προϊόντα προερχόμενα από τις μέλισσες, εναντία σε ασθένειες και βακτηριακές λοιμώξεις. Πλέον ένας μεγάλος αριθμός μελιών, με τυποποιημένα επίπεδα αντιβακτηριδιακής δραστηριότητας, είναι διαθέσιμος. Το μέλι που προέρχεται από το φυτό *Leptospermum scoparium*, κοινώς γνωστό και ως μέλι Manuka, είναι το πιο γνωστό

παγκοσμίως μέλι, και έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει ανασταλτικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη περίπου 60 ειδών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων αερόβιων, αναερόβιων, gram-θετικών και gram-αρνητικών (Molan, 1992).

Το μέλι αποτελεί ένα θεραπευτικό παράγοντα που πρόσφατα ανακαλύφθηκε ξανά από τον ιατρικό κλάδο, ιδιαίτερα σε τομείς όπου οι κοινοί θεραπευτικοί τρόποι αποτυγχάνουν. Η πρώτη γραπτή αναφορά για το μέλι προέρχεται από μια σουμεριακή επιγραφή που χρονολογείται το 2100-2000 π.Χ., και αναφέρει τη χρήση του ως φάρμακο και είδος αλοιφής. Ο Αριστοτέλης αναφέρει ότι το μέλι κατέχει καταπραϋντικές ιδιότητες όταν εφαρμόζεται σε πληγές. Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί από αρχαιότερων χρόνων, όπως αναφέρθηκε, ως ένας τρόπος επιτάχυνσης της διαδικασίας επούλωσης πληγών (Van den Berg et al., 2008), και επανειλημμένα έχει αποδειχθεί η ικανότητα του αυτή (Molan, 2006; Simon et al., 2008). Το μέλι τελευταία κερδίζει έδαφος στην αποδοχή του από την ιατρική κοινότητα ως ένας αποτελεσματικός παράγοντας στη θεραπεία του στομαχικού έλκους, καθώς και των πληγών κατάκλισης και μολύνσεων του δέρματος από πληγές ή εγκαύματα (Cooper et al., 2002; Cooper et al., 2002).

Οι θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού μπορούν εύκολα να αποδοθούν στο γεγονός ότι προσφέρει αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα, διατηρεί το περιβάλλον της πληγής με τα σωστά επίπεδα υγρασίας προάγοντας έτσι τη γρήγορη επούλωση πληγών, και επίσης εξαιτίας του μεγάλου ιξώδους του δημιουργεί ένα προστατευτικό κάλυμμα από περεταίρω μόλυνση των πληγών (Lusby et al., 2005).

Υπάρχουν πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία ότι το μέλι είναι αποτελεσματικό ενάντια σε πληγές, εγκαύματα, δερματικά έλκη και φλεγμονές, καθώς το μέλι επιταχύνει την ανάπτυξη καινούριου ιστού επουλώνοντας με γρήγορο ρυθμό τις πληγές (Lusby et al., 2002). Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων ταυτόχρονα με το μικρό ποσοστό υγρασίας επιφέρει ωσμωτικό στρες, το οποίο αποτρέπει την αλλοίωση του μελιού από τους μικροοργανισμούς. Ωστόσο ακόμα και μικρή διάλυση του μελιού στο νερό μπορεί να επιφέρει την ανάπτυξη μυκήτων, αλλά η συγκέντρωση των σακχάρων είναι αρκετή για να αποτρέπει την ανάπτυξη βακτηρίων έως και 30-40% διάλυση. Σε μεγαλύτερο ποσοστό διάλυσης άλλες ουσίες του μελιού είναι υπεύθυνες για την διατήρηση της αντιμικροβιακής του ικανότητας.

Η μεγαλύτερη πλειοψηφία του πληθυσμού σε μια κυψέλη μελισσών αποτελείται από μέλισσες εργάτριες, οι οποίες επωμίζονται και το μεγαλύτερο αριθμό εργασιών στην κυψέλη. Ένα συγκεκριμένο είδος εργασίας συνήθως εκτελείται από εργάτριες συγκεκριμένης ηλικίας. Το καθάρισμα και κάλυμμα των κελίων από τις νεότερες σε ηλικία μέλισσες, η φροντίδα και σίτιση της βασίλισσας από μέλισσες ηλικίας 4-16 ημερών, η διαχείριση του φαγητού και το χτίσιμο της κυψέλης από τις μέλισσες μέσης ηλικίας και τέλος τόσο η υπεράσπιση της κυψέλης όσο και η συλλογή τροφής αναλαμβάνεται από τις μεγαλύτερες σε ηλικία μέλισσες (15-30 ημερών) (Winston 1987). Μια από τις πιο σημαντικές εργασίες είναι η συλλογή νέктar από ανθοφόρα φυτά από μέλισσες επωμισμένες με τη διαδικασία συλλογής, και τη μεταφορά του σε κελία στην αποικία. Εκεί το νέκταρ μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατευθείαν ως τροφή ή μπορεί να επεξεργαστεί μέσω της διαδικασίας της παλινδρόμησης μεταφερόμενο ανάμεσα στις μέλισσες, όπου τελικά αφού έχει αναμιχτεί με εκκρινόμενα ένζυμα, μεταφέρεται στα κελία για αποθήκευση. Στα κελία, αφού εξατμιστεί ένα ποσοστό νερού, το απομένον υλικό κατεργάζεται από τις μέλισσες στο τελικό προϊόν που είναι το μέλι. Αυτό το μέλι χρησιμοποιείται, τόσο ως μια δεξαμενή τροφής για την κυψέλη, όσο και ως αντιβακτηριδιακός παράγοντας για την απολύμανση της κυψέλης (De Grandi-Hoffman and Hagler, 2000; Seeley, 1992).



Όταν το νέκταρ εισέλθει στο στομάχι της μέλισσας, σταδιακά μετατρέπεται σε μέλι. Τα ένζυμα από τους αδένες της κεφαλής που ονομάζονται διαστάσεις-ιμπερτάσεις και ένζυμα από το θωρακικό αδένα (οξειδάση της γλυκόζης) αναμιγνύονται με το νέκταρ με σκοπό την ανάπτυξη της γεύσης και του αρώματος του μελιού (Abdullah and Clemencia, 2009). Η διαδικασία μετατροπής του νέκταρ σε μέλι ξεκινά από τον πρόλοβο της μέλισσας με προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες της. Αυτοί είναι ανεπτυγμένοι στην νεαρή εργάτρια και είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό του βασιλικού πολτού (White, 1993). Στις μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες μέλισσες οι αδένες αυτοί συρρικνώνονται και παράγουν το ένζυμο ιμπερτάση, που είναι απαραίτητο για την

μετατροπή του νέκταρ σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει την γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ (Abdullah and Clemencia, 2009, White, 1993). Επίσης, το μέλι εμπλουτίζεται συνεχώς με ένζυμα από τους αδένες της εργάτριας μέλισσας.

1.1 Σύσταση του μελιού

Το μέλι αποτελείται κυρίως από υδατάνθρακες, από τους οποίους η γλυκόζη και η φρουκτόζη βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (Abdullah Adiland Clemencia, 2009). Η συνολική ποσότητα των σακχάρων είναι περίπου 80% (Φρουκτόζη: 38.2%, Γλυκόζη: 31,3%, Μαλτόζη: 7,1%, Σουκρόζη: 1,3%) και <18% νερό (περίπου 17,2%) (USDA, 2015), συνδυασμός που προκαλεί ισχυρό οσμωτικό στρες και δεν επιτρέπει την αλλοίωση του μελιού από μικροοργανισμούς (Kwakman, 2012).

Συστατικά όπως η λυσοζύμη, φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή είναι παρόντα στο μέλι (Snowdon and Cliver, 1996). Το μέλι περιέχει αντιοξειδωτικά (όπως οι πολυφαινόλες) τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση και τις λειτουργικές ιδιότητες του μελιού. Το ενδιαφέρον για αυτές τις ενώσεις συνεχώς αυξάνεται διότι δυνητικά χρησιμεύουν σαν βιοχημικοί δείκτες για την επικύρωση γεωγραφικής προέλευσης και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων. Τρεις είναι οι κύριες φαινολικές ουσίες (βενζοϊκό οξύ, κινναμωμικά οξέα και φλαβονοειδή). Τα φλαβονοειδή είναι τα πιο συχνά απαντώμενα σε μέλια ανθέων και η συγκέντρωσή τους στο μέλι είναι περίπου 20 mg/kg (Alvarez-Suarez et al., 2010). Τα φλαβονοειδή προέρχονται από την πρόπολη, μια καφέ ή κόκκινη ρητινώδη ουσία που συλλέγεται από τις μέλισσες από τα μπουμπούκια δέντρων, η οποία χρησιμοποιείται από αυτές ως αντιμικροβιακός παράγοντας στις κυψέλες (Marcucci, 1995).

Τα ιχνοστοιχεία του μελιού είναι απαραίτητα συμπληρωματικά στοιχεία για τον υγιή άνθρωπο. Στο μέλι μέχρι στιγμής έχουν ανιχνευτεί 4 από τα 9 απαραίτητα ιχνοστοιχεία. Συγκεκριμένα, έχει ανιχνευτεί ο σίδηρος, ο χαλκός, το μαγγάνιο, και το πυρίτιο. Επίσης, τα οργανικά οξέα του μελιού διαμορφώνουν κατά ένα μεγάλο μέρος την οσμή του, τη γεύση και τέλος ασκούν ευνοϊκή επίδραση στην όρεξη. Στο μέλι έχει βρεθεί το γλυκονικό, το μηλικό, το κιτρικό, το γαλακτικό και άλλα οξέα. Η περιεκτικότητα του μελιού σε βιταμίνες είναι χαμηλή. Βιταμίνες όπως φυλοκινόνη (K), θειαμίνη (B1), ριβοφλαβίνη (B2), πυριδοξίνη (B6) και νιασίνη απαντώνται στο μέλι.

Το μέλι αποτελείται από περισσότερες από εκατό διαφορετικές ουσίες (συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών και μεταβατικών μετάλλων). Οι χημικές συγκεντρώσεις όλων των παραπάνω ουσιών στα διάφορα είδη μελιού (ανθόμελο, πευκόμελο, καστανιάς και άλλων) διαφέρουν, ανάλογα με τη βοτανική τους προέλευση (Alvarez-Suarez et al., 2010).

1.2 Οι αντιμικροβιακές-αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού

Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί ως παραδοσιακό φάρμακο λόγω των αντιμικροβιακών και θεραπευτικών του ιδιοτήτων από την αρχαιότητα (Zumla and Lulat, 1989). Στα υπάρχοντα κλινικά περιβάλλοντα εμφανίζονται όλο ένα και περισσότερα ανθεκτικά σε αντιβιοτικά είδη βακτηρίων και αυτό καθιστά απαραίτητη την άμεση αναζήτηση εναλλακτικών θεραπευτικών παραγόντων. Η αντιβακτηριακή του δράση οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το χαμηλό pH και η υψηλή όσμωση (το μέλι αποτελείται από 80% (w/v) σάκχαρα) που είναι και οι μόνοι καλά χαρακτηρισμένοι αντιβακτηριακοί παράγοντες (Anthimidou and Mossialos, 2012; Kwakman et al., 2010; Molan et al, 1992). Η μεθυλ-γλυοξάλη και το πεπτίδιο της μέλισσας αμυντοσύνη-1 (bee defensin-1) έχουν ανακαλυφθεί ως σημαντικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες προερχόμενοι από συγκεκριμένα είδη μελιών. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι οι αντιμικροβιακοί παράγοντες εμφανίζουν επικαλυπτόμενη δραστηριότητα (Adams et al, 2008; Kwakman et al, 2010; Kwakman et al, 2011).

Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού εξαρτώνται από τη γεωγραφική του προέλευση (Al-Waili et al., 2011). Συνήθως είναι γνωστή η γεωγραφική και όχι η ακριβής βοτανολογική προέλευση του μελιού. Είναι πολύ πιθανό η αντιμικροβιακή ικανότητα του μελιού να εξαρτάται σε μεγαλύτερο βαθμό από το βοτανολογικό του προφίλ καθώς μέλια τα οποία έχουν μονοπολική προέλευση αλλά διαφορετική γεωγραφική εμφανίζουν τις ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες (Persando Oddo et al., 2004). Γενικά έχει βρεθεί ότι σκουρόχρωμα μέλια εμφανίζουν συγκρίσιμες αντιμικροβιακές ιδιότητες με το μέλι Manuka, μέλια που προέρχονται από μελίτωμα, μέλι από καστανιές, μέλια από ερείκη και βαμβάκι, εν' αντιθέσει μελιών με πιο ανοιχτό χρώμα που έχουν μικρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα (Bogdanov, 2012).

Μικροβιακή ανθεκτικότητα στο μέλι δεν έχει αναφερθεί (Dixon, 2003), γεγονός το οποίο καθιστά το μέλι έναν πολλά υποσχόμενο αντιμικροβιακό παράγοντα ενάντια σε λοιμώξεις από ανθεκτικά σε αντιβιοτικά βακτήρια, και λοιμώξεις πάνω σε χρόνια τραύματα τα οποία δεν ανταποκρίνονται σε κοινές αντιβιοτικές θεραπείες. Το μέλι Manuka είναι ευρέως γνωστό σε παγκόσμιο επίπεδο για τις θεραπευτικές του ιδιότητες και έχει ερευνηθεί εκτενώς, όμως είναι αναγκαίο να συνεχιστεί η έρευνα σε διάφορα είδη μελιών με διαφορετικές γεωγραφικές προελεύσεις, όπως το Μαλαισιανό Tualang ή ακόμα και τα Ελληνικά μέλια, καθώς η δραστηριότητα τους ενάντια σε μικροοργανισμούς είναι πολύ μεγάλη, γεγονός το οποίο τα καθιστά δυνητικούς υποψηφίους για τη χρήση τους ως θεραπευτικοί παράγοντες και λειτουργικά τρόφιμα.

Είναι κοινώς αποδεκτό ότι η αντιβακτηριδιακή ικανότητα που εμφανίζουν διάφορα είδη μελιών είναι αποτέλεσμα της συγκέντρωσης των σακχάρων, της οξύτητας, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, της μεθυλ-γλυοξάλης, και του πεπτιδίου αμυντοσύνη-1 της μέλισσας. Παρόλο που έχουν γίνει πολλές μελέτες δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν τα παραπάνω. Έχουν επίσης βρεθεί και άλλοι παράγοντες που συνδράμουν στην αντιμικροβιακή ικανότητα του μελιού, όπως φλαβονοειδή, φαινόλες και λυσοζύμη.

Η αντιμικροβιακή ικανότητα μεταξύ διαφορετικών ειδών μελιών διαφέρει και εξαρτάται κυρίως από την βοτανική, την εποχιακή και τη γεωγραφική τους προέλευση παρόλο που και ο τρόπος συγκομιδής, η επεξεργασία και οι συνθήκες φύλαξης μπορεί να παίζουν ρόλο στη διαμόρφωση της αντιμικροβιακής ικανότητας τους. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά ως αντιβακτηριακοί παράγοντες, τα εξής συστατικά:

i) Τα σάκχαρα

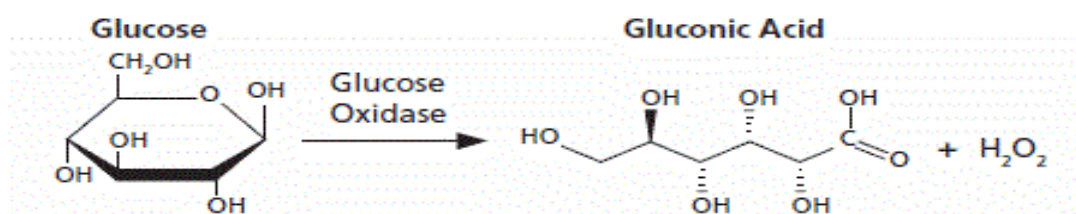
Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων σε συνδυασμό με το μικρό ποσοστό υγρασίας επιφέρει ωσμωτικό στρες, το οποίο αποτρέπει την αλλοίωση του μελιού από τους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, ακόμα και μικρή διάλυση του μελιού στο νερό μπορεί να επιφέρει την ανάπτυξη μυκήτων, αλλά η συγκέντρωση των σακχάρων είναι αρκετή για να αποτρέπει την ανάπτυξη βακτηρίων έως και 30-40% διάλυση. Σε μεγαλύτερο ποσοστό διάλυσης άλλες ουσίες του μελιού είναι υπεύθυνες για την διατήρηση της αντιμικροβιακής του ικανότητας. Άρα τα σάκχαρα αποτελούν ισχυρό αντιμικροβιακό παράγοντα (Kwakman et al, 2010; Kwakman, 2012).

ii) Χαμηλό pH

Έχει αποδειχθεί ότι η αντιμικροβιακή ικανότητα του μελιού είναι μεγαλύτερη σε όξινα μέσα σε αντίθεση με ουδέτερα ή αλκαλικά μέσα όπου η ικανότητα μειώνεται, παρόλα αυτά δεν χάνεται (Al-Waili, 2004). Επομένως είναι σίγουρο ότι η οξύτητα του μελιού παίζει ρόλο στην ικανότητα του να μειώνει τον πληθυσμό παθογόνων μικροοργανισμών χωρίς όμως να είναι ο μόνος παράγοντας. Επίσης η ύπαρξη σακχάρων στο μέλι από μόνη της δεν μπορεί να αντιμετωπίσει την ανάπτυξη μικροβίων, καθώς μπορεί η μεγάλη συγκέντρωση να είναι ανασταλτικός παράγοντας για πολλά είδη βακτηρίων, αλλά είδη όπως *Klebsiella* spp. και *Proteus* sp, μπορούν και επιβιώνουν σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 70-90% (Al-Waili, 2004), γεγονός που καταδεικνύει την ύπαρξη και άλλων παραγόντων που λειτουργούν συνεργιστικά στην καταπολέμηση μικροοργανισμών. Η συνεισφορά του χαμηλού pH (μεταξύ 3,2 και 4,5) για την αντιβακτηριακή δράση είναι γενικά αμφιλεγόμενη, αλλά τελευταίες μελέτες έχουν αποδείξει το ρόλο του pH σε αυτή τη δράση του μελιού (Kwakman, 2012).

iii) Υπεροξειδίο του υδρογόνου

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου θεωρείται γενικά ως ο πιο σημαντικός παράγοντας υπεύθυνος για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες που παρουσιάζει το μέλι (White et al 1963; Weston, 2000; Brudzynski, 2006). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου στο μέλι παράγεται κατά την οξείδωση της γλυκόζης από το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (White et al, 1963).



Η λειτουργία του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι να αποτρέπει την αλλοίωση του μελιού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, κατά την οποία η συγκέντρωση των σακχάρων δεν έχει φτάσει τα επίπεδα τα οποία είναι ικανά να αποτρέψουν την μικροβιακή αλλοίωση. Κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης η οξείδωση της γλυκόζης απενεργοποιείται αλλά μπορεί να ανακτήσει τη δραστηριότητα της σε διάλυση του μελιού σε νερό. Μέγιστη δραστηριότητα επιτυγχάνεται σε διαλύσεις της τάξεως του 30-50%, αλλά κάτω από 30% το ένζυμο χάνει τη δραστηριότητα του λόγω της μικρής σχετικά συγγένειας του με το υπόστρωμα του, τη γλυκόζη.

Τα επίπεδα συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μέλι εξαρτώνται από τη διαφορά μεταξύ του ρυθμού παραγωγής και του ρυθμού διάσπασης του από καταλάσες. Η οξείδωση της γλυκόζης εισάγεται από τις μέλισσες κατά τη διάρκεια της συλλογής του νέктar. Το ένζυμο αυτό απαντάται σε όλα τα είδη μελιών αλλά η συγκέντρωση του διαφέρει από μέλι σε μέλι και εξαρτάται από την ηλικία και την υγεία των μελισσών (Pernal and Curie, 2000), καθώς και από την ποιότητα και ποικιλία της διατροφής αυτών που συλλέγουν το μέλι (Alaux et al, 2010). Όπως και στο μέλι, το υπεροξειδίο του υδρογόνου αποτελεί το σημαντικότερο αντιμικροβιακό παράγοντα για το νέκταρ των φυτών (Carter and Thornburg., 2004) καθώς έχει βρεθεί σημαντική διακύμανση στη συγκέντρωση του υπεροξειδίου σε δείγματα νέκταρ (Hillwig et al., 2010; Hillwig et al., 2011). Τα επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να διαφέρουν από μέλι σε μέλι ασχέτως της γεωγραφικής και βοτανολογικής προέλευσης τους (Brudzynski et al. 2011). Ως παράγοντες που επηρεάζουν την συνολική συγκέντρωση του ενδογενούς υπεροξειδίου στο μέλι, έχουν προταθεί οι ακόλουθοι: α) Αδρανοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης λόγω θέρμανσης ή έκθεσης σε ακτινοβολία (White et al. 1963), β) χημική εξάλειψη του υπεροξειδίου (White et al. 1963), γ) καταστροφή του υπεροξειδίου από καταλάση προερχόμενη από το νέκταρ και τη γύρη (Brudzynski 2006), δ) τροποποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης από τη μέθυλ-γλυοξάλη (Majtan et al. 2014), ε) αυτοοξείδωση από πολυφαινόλες και φλαβονοειδή (Brudzynski 2006). Ακόμα ένας πολύ πιθανός παράγοντας για την παρέκκλιση στην συγκέντρωση του υπεροξειδίου μεταξύ των μελιών, μπορεί είτε να αποτελεί η διαφορά ανάμεσα στα επίπεδα συγκέντρωσης της οξειδάσης της γλυκόζης ή η ενζυμική δραστηριότητα της οξειδάσης, που μπορεί να επηρεαστεί

σημαντικά από συστατικά τα οποία υπάρχουν στο μέλι, και προέρχονται κυρίως από τη διατροφή των μελισσών (Alaux et al. 2010).

Σημαντική είναι η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της έκτασης της αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης στο μέλι (White et al., 1963; Brudzynski, 2006). Έχει παρατηρηθεί ότι σε μέλια με μεγάλες συγκεντρώσεις αυτής της οξειδωτικής ουσίας, τα βακτήρια δεν μπορούν να ανταποκριθούν κανονικά στις λειτουργίες απαραίτητες για τη διατήρηση της ζωής τους και η ανάπτυξη τους επιβραδύνεται ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις των μελιών αυτών. Εφαρμογή καταλάσης σε μέλια, επαναφέρει έως ένα συγκεκριμένο βαθμό την βακτηριακή ανάπτυξη, υποδηλώνοντας ότι το ενδογενές υπεροξείδιο του υδρογόνου εμπλέκεται στην επιβράδυνση της βακτηριακής ανάπτυξης (Brudzynski, 2006; Anthimidou and Mossialos, 2012).

Τα περισσότερα συμπεράσματα για την οξειδωτική δράση του υπεροξειδίου στα βακτήρια εξάγονται από απλουστευμένα *in-vitro* μοντέλα στα οποία παρατηρούνται απευθείας επιπτώσεις του. Προσφάτως έχει αποδειχθεί ότι το μέλι είναι ένα δυναμικό μίγμα συστατικών το οποίο διευκολύνει και προάγει την αντίδραση Maillard (Brudzynski and Miotto, 2011b). Οι αντιδράσεις Maillard αρχικά περιλαμβάνουν αντιδράσεις μεταξύ αμινομάδων των αμινοξέων των προτεΐνων με καρβοξυλ-ομάδες των αναγωγικών σακχάρων, που οδηγούν σε πολλά μονοπάτια οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, στα οποία παρατηρείται δημιουργία και απώλεια πάρα πολλών βιοενεργών μορίων. Οι πολυφαίνολο-μελανοϊδίνες, είναι μια βασική ομάδα που παράγεται από τις αντιδράσεις Maillard και έχει την ιδιότητα να καταστρέφει ελεύθερες ρίζες (Brudzynski and Miotto, 2011a,b). Αυτά τα συστατικά υπάρχει πιθανότητα να αλληλεπιδράσουν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, πράγμα που εξαρτάται πρωτίστως από τη συγκέντρωσή τους και κατά δεύτερο λόγο από την οξειδοαναγωγική τους ικανότητα, με αποτέλεσμα να αυξήσουν ή να μειώσουν την οξειδωτική ικανότητα του υπεροξειδίου και κατ' επέκταση του μελιού. Συνεπώς κάτω από αυτό το πρίσμα μπορούμε να υποθέσουμε ότι η οξειδωτική δράση που εμφανίζει το υπεροξείδιο του υδρογόνου στα βακτηριακά κύτταρα, ρυθμίζεται από την παρουσία ή όχι διάφορων βιοενεργών μορίων στο μέλι.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιείται ευρέως στην απολύμανση και αποστείρωση ιατρικού εξοπλισμού. Γί' αυτό το σκοπό μεγάλες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου (εύρους από 0.8-8M) πρέπει να χρησιμοποιούνται για να διαπερνούν τους μηχανισμούς άμυνας των βακτηρίων με μεγάλη αποτελεσματικότητα (Rutala et al., 2008). Ωστόσο η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μέλι είναι έως και 900 φορές μικρότερη από τις προαναφερθείσες με αποτέλεσμα να καθίσταται επιτακτική η ανάγκη περεταίρω μελέτης του τρόπου δράσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μέλι και της συνέργειας των συστατικών του.

Παρόλο που η συγκέντρωση του υπεροξειδίου στο μέλι δεν είναι αρκετή για να σκοτώσει βακτήρια, έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά και να σταματά τα σήματα που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων, συνεπώς μειώνει την βακτηριακή ανάπτυξη ακόμα και σε μεγάλη διάλυση στο νερό (Brudzynski 2006). Είναι γενικώς αποδεκτό ότι το ενδογενές υπεροξείδιο του

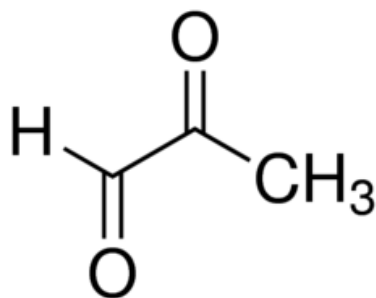
υδρογόνου, το οποίο παράγεται από το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, αποτελεί τον κυριότερο αντιμικροβιακό παράγοντα στα περισσότερα είδη μελιών, (White et al., 1963). Υπάρχει πολύ μεγάλη συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται από συγκεκριμένα μέλια και της αντιμικροβιακής και αντιμυκητιακής ικανότητας τους (Taormina et al., 2001; Brudzynski, 2006; Chen et al., 2012). Επίσης η δράση του υπεροξειδίου είναι κυρίως υπεύθυνη για τη ικανότητα να εξουδετερώνουν βακτήρια τα Σλοβενικά μέλια (Kuncic et al., 2012). Κάποια είδη μελιών έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν το DNA λόγω της ύπαρξης ενδογενούς υπεροξειδίου και άλλων αγνώστων παραγόντων (Brudzynski et al., 2012). Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι το μέλι ελαιοκράμβης και το μέλι ευκαλύπτου παρουσιάζουν ψηλά επίπεδα υπεροξειδίου (754 και 645μM αντίστοιχα) αλλά καθόλου έως ελάχιστη αντιμικροβιακή ικανότητα, ενώ άλλα μέλια με περίπου την ίδια συγκέντρωση υπεροξειδίου (526μM) εμφανίζουν πολύ καλή δράση (Brudzynski et al., 2011).

Αυτό υποδεικνύει καθαρά ότι το υπεροξείδιο δεν είναι η κυρία απάντηση του ερωτήματος, πως δρα το μέλι όταν εξουδετερώνει βακτήρια. Όπως προαναφέρθηκε, οι συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου στο μέλι είναι 900 φορές μικρότερες από τις προβλεπόμενες συγκεντρώσεις αναγκαίες για απολύμανση, και αυτό αποδεικνύει ότι η ύπαρξη άλλων φυσικών συστατικών μέσα στο μέλι βελτιστοποιούν την δράση του υπεροξειδίου (Kwakman et al., 2008; Molan, 2006; Cushnie and Lamb, 2005). Η απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από καταλάση εξαλείφει την αντιβακτηριδιακή δράση η οποία οφείλεται τόσο στο υπεροξείδιο όσο και σε φαινόλες. Προκύπτει ότι οι φαινόλες αποτελούν ενδιάμεσα, τα οποία συνδράμουν στην οξειδωτική ικανότητα του υπεροξειδίου και συνεπώς παρέχουν τρόπους στην αύξηση του οξειδωτικού στρες, ώστε το μέλι τελικώς να εμφανίζει ιδιότητες αποσύνθεσης του DNA των βακτηρίων (Brudzynski et al., 2012).

Όπως προαναφέρθηκε η επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στην ανάπτυξη και επιβίωση των μικροοργανισμών στο μέλι μπορεί να αυξάνεται ή να μειώνεται εξαιτίας της ύπαρξης διάφορων συστατικών. Από τη μια η μεγάλη συγκέντρωση σακχάρων στο μέλι αποσπά μόρια νερού λόγω ωσμωτικής πίεσης και δρα ως ανασταλτικός παράγοντας στον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων, αλλά από την άλλη διαλύματα μελιού αποτελούν τεράστια πηγή άνθρακα για τα βακτήρια λόγω της αφθονίας των σακχάρων. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να έχει ανασταλτικές ιδιότητες στην ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό και επιβίωση των βακτηρίων αλλά η ύπαρξη στο μέλι αντιοξειδωτικών όπως η καταλάσες, οι πολυφαινόλες, τα παράγωγα των αντιδράσεων Maillard και το ασκορβικό οξύ μπορεί να μειώνουν το οξειδωτικό στρες και να έχουν προστατευτικό ρόλο εναντίον του ενδογενούς υπεροξειδίου (Brudzynski, 2006). Ακόμα λιγότερες πληροφορίες υπάρχουν για τους μηχανισμούς με τους οποίους το ενδογενές υπεροξείδιο των μελιών επιδρά πάνω στα κύτταρα, όπως ποιοι είναι οι στόχοι του υπεροξειδίου και αν οι συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου στο μέλι προκαλούν αλλοιώσεις και τελικά διάσπαση του DNA των κυττάρων στόχων.

iv) Άλλες αντιβακτηριακές ουσίες

Η μέθυλ-γλυοξάλη είναι κοινώς αποδεκτό ότι αποτελεί το κύριο συστατικό υπεύθυνο για την αντιμικροβιακή δραστηριότητα του μελιού Manuka. Μέχρι τώρα δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός σχηματισμού της στο μέλι Manuka. Μη ενζυματικός σχηματισμός της μέθυλ-γλυοξάλης μέσω αντιστροφής της αντίδρασης σχηματισμού αλδολών (αντίδραση σχηματισμού δεσμού άνθρακα - άνθρακα) κατά



τη διάρκεια θέρμανσης ή έναρξη των αντιδράσεων Maillard και αντιδράσεων καραμελοποίησης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του μελιού μπορούν να αποκλειστούν (Mavric et al., 2004), καθώς δεν παράγονται ανιχνεύσιμα επίπεδα υδρόξυ-μέθυλο-φουρφοουράλης. Η υδρόξυ-μέθυλο-φουρφοουράλη αποτελεί ένα χαρακτηριστικό δείκτη θερμικής επεξεργασίας, όντας βασικό προϊόν της θέρμανσης σακχάρων. Η

μέθυλ-γλυοξάλη είναι γνωστή ως ένα βασικό παραπροϊόν της αυξημένης γλυκόλυσης στα βακτήρια (Ferguson et al., 1998), συνεπώς μικροβιολογική προέλευση της 1,2-διακαρβονυλο ένωσης δεν πρέπει να παραβλέπεται. Επίσης, η παράγωγη μέθυλ-γλυοξάλης σε διάφορα είδη φυτών, που κυμαίνεται σε επίπεδα 30–75 μM , έχει βρεθεί και είναι πολύ πιθανό να οφείλεται σε απόκριση της από φυτά σε καταστάσεις αυξημένου στρες, όπως αυξημένη ανυδρία, αλμυρότητα και ψύχος. Δεν είναι γνωστό αν αυτό ισχύει και για το φυτό *Leptospermum scoparium*, ούτως ώστε οι μέλισσες να επεξεργάζονται τη γύρη του σε νέктar και στη συνέχεια σε μέλι Manuka, καθιστώντας το ως το τρόφιμο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μέθυλ-γλυοξάλης, καθώς δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν η βοτανολογική προέλευση έχει άμεση επίδραση στην παραγωγή της ουσίας αυτής.

Οι καταστροφικές ιδιότητες της μέθυλ-γλυοξάλης σε κάποιες πρωτεΐνες στο μέλι Manuka (Majtan et al., 2012), είναι ο λόγος για την ανικανότητα του μελιού να παράγει ικανοποιητικά επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς μπορεί να συσχετιστεί η μέθυλ-γλυοξάλη με την καταστροφή της οξειδάσης της γλυκόζης.

Έχει διερευνηθεί η προσθήκη εξωγενούς μέθυλ-γλυοξάλης σε μέλια διαφορετικού είδους από το Manuka, και κατά πόσο η προσθήκη αυτή επηρεάζει την ικανότητα των μελιών να παράγουν υψηλές ποσότητες ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου (Majtan et al., 2014). Η μέθυλ-γλυοξάλη μειώνει αισθητά την παραγωγή ενδογενούς υπεροξειδίου σε διάφορα μέλια, αφού επεμβαίνει και αλλοιώνει τη δομή της οξειδάσης της γλυκόζης, μειώνοντας την ενζυμική δραστηριότητα της.

Έχει τεκμηριωθεί ότι οι μεγάλες συγκεντρώσεις της μέθυλ-γλυοξάλης στο μέλι Manuka τροποποιούν την αμυντοσίνη-1 (bee defensin-1), ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο που προέρχεται από τις μέλισσες και επίσης την κυρίαρχη στο μέλι πρωτεΐνη MRJP1 (Majtan et al., 2012). Εξαιτίας αυτών των τροποποιήσεων στη δομή του πεπτιδίου της αμυντοσίνης-1, αυτό χάνει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του. Συνεπώς, για να αξιολογηθεί αν η μέθυλ-γλυοξάλη έχει σημαντικές επιδράσεις στη δομή της οξειδάσης, προστέθηκε σε μέλια σε συγκεντρώσεις ανάλογες σε αυτές που απαντάται στο μέλι Manuka, και μετρήθηκαν τα επίπεδα του ενδογενούς

υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η χαρακτηριστική ελάττωση των επιπέδων του υπεροξειδίου καταδεικνύει ότι η μέθυλ-γλυοξάλη επιδρά πάνω στην οξειδάση της γλυκόζης με παρόμοιο τρόπο με το πεπτίδιο της αμυντισυνης-1, μετασχηματίζοντας τη δομή της και ταυτόχρονα μειώνοντας την ικανότητα παράγωγης υπεροξειδίου του υδρογόνου (Majtan et al., 2014).

Προσφάτως βρέθηκε ότι η μέθυλ-γλυοξάλη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10mM προκαλεί άρση της ικανότητας μερικών αντιοξειδωτικών ένζυμων, λόγω τροποποίησης της πεπτιδικής αλυσίδας των ενζύμων αυτών (Lankin et al., 2012). Αντιθέτως, δεν επιφέρει καμιά μορφολογική αλλαγή στην ανθρώπινη καταλάση και δεν επηρεάζει την ενζυμική της δραστηριότητα. Όντας η καταλάση ένα συστατικό της γύρης των φυτών και κάποιων μελιών κατά συνέπεια (Dustmann, 1971), μπορεί επίσης να είναι υπεύθυνη, εκτός από τη μέθυλ-γλυοξάλη, για την καταστροφή του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μέλι Manuka, χωρίς όμως να υπάρχουν ενδεικτικά στοιχεία για το γεγονός αυτό.

Από διατροφικής άποψης, η σημασία της πρόσληψης της μέθυλ-γλυοξάλης και άλλων 1,2-δικαρβονυλο ενώσεων δεν αποτελεί ένα πεδίο ευρέως μελετημένο. Ουσίες που είναι προϊόντα της γλυκόλυσης, και προέρχονται από την αντίδραση της μέθυλ-γλυοξάλης με αλυσίδες αμινοξέων λυσίνης και αργινίνης, έχουν ταυτοποιηθεί *in vivo* και έχουν συσχετιστεί με επιπλοκές που εμφανίζονται σε ασθένειες όπως ο διαβήτης και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, χωρίς όμως να έχει προσδιοριστεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης αυτών των ουσιών κατά την εξέλιξη της πάθησης (Henle, 2005; Henle and Miyata, 2003; Nemet et al., 2006).

Πληροφορίες για την πιθανή τοξικότητα της μέθυλ-γλυοξάλης που λαμβάνεται με την τροφή, είναι σπάνιες και αντικρουόμενες, καθώς η πρόσληψη της έχει συνδράμει στην εμφάνιση αντικαρκινικών αποτελεσμάτων (Nemet et al., 2006; Kalapos, 1999; Ghosh et al., 2006). Οι φυσιολογικές επιπτώσεις που τυγχάνουν να υπάρχουν από την διατροφική πρόσληψη της μέθυλ-γλυοξάλης, μένει να ερευνηθούν περεταίρω με αναλύσεις, οι οποίες οφείλουν να αντιπαραθέτουν τους κινδύνους και τα οφέλη, και να δίνουν απαντήσεις για τη διατροφική αξία της ουσίας αυτής.

Συμπερασματικά, η μέθυλ-γλυοξάλη είναι μια ουσία που απαντάται σε μεγάλες ποσότητες στο μέλι Manuka σε σχέση με άλλα τρόφιμα, και αποτελεί τη βιοδραστική ουσία υπεύθυνη για την εμφάνιση της μεγάλης αντιμικροβιακής δραστηριότητας του μελιού αυτού. Η μέθυλ-γλυοξάλη είναι υπεύθυνη για την τροποποίηση των πρωτεϊνικών συστατικών του μελιού Manuka, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που συμβάλουν στην αντιμικροβιακή του δραστηριότητα, και καθίσταται έτσι ως το κύριο και πιθανόν μοναδικό αντιμικροβιακό συστατικό του μελιού αυτού. Είναι ανάγκη να μελετηθούν οι μηχανισμοί σχηματισμού της ουσίας αυτής, ώστε να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τα βιοχημικά μονοπάτια και τους τρόπους δράσης της, τόσο σε μοριακό επίπεδο όσο και για την αξία της στη διατροφή.

Ένα ακόμα συστατικό του μελιού είναι το αντιβακτηριακό πεπτίδιο αμυντοσυνης-1 (bee defensin-1) που ταυτοποιήθηκε αρχικά στο Revamil source (RS) μέλι και αργότερα στο Manuka αλλά και σε άλλα μέλια, χωρίς να έχει ανιχνευτεί συστηματικά σε αυτά. Το πεπτίδιο συνεισφέρει σημαντικά στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα του μελιού ενάντια σε Gram-θετικά βακτήρια, αλλά είναι μη

αποτελεσματικό ενάντια σε Gram-αρνητικά (Majtan et al. 2012). Το πεπτίδιο αυτό παράγεται από τον υποφαρυγγικό αδένα της μέλισσας, ο οποίος χρησιμοποιείται στην παραγωγή του μελιού. Η συγκέντρωση του αντιβακτηριακού πεπτιδίου διαφέρει από μέλι σε μέλι, γεγονός που υποδηλώνει την ανάγκη να υπάρξουν περεταίρω έρευνες για τις ιδιότητες του πεπτιδίου αυτού ώστε να καθοριστεί τόσο η συγκέντρωση του στα διάφορα είδη μελιών όσο και η αντιβακτηριδιακή του δραστηριότητα.

Φαινολικές ενώσεις παρούσες στο νέκταρ και στο μέλι παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Gil et al., 1995; Ferreres et al., 1996), ενώ παράλληλα έχει αποδεδειχθεί ότι φαινολικά αντιοξειδωτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων (Davidson, 1993). Έχουν βρεθεί πολλά μέλια με μεγάλη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών και η δράση τους έχει συσχετιστεί τόσο με τη συγκέντρωση ύδατος όσο και με το χρώμα των μελιών (Frankel et al., 1998). Πιο σκούρο χρώμα στο μέλι υποδηλώνει συνήθως την ύπαρξη μεγαλύτερης συγκέντρωσης καροτενοειδών και φλαβονοειδών, τα περισσότερα από τα οποία εμφανίζουν αντιοξειδωτικό χαρακτήρα. Δεν είναι όμως γνωστό στη βιβλιογραφία, αν η διαφορά χρώματος στο μέλι, η οποία οφείλεται στη διαφορετική φυτική προέλευση, έχει κάποιο σημαντικό ρόλο στην ικανότητα του να εξουδετερώνει παθογόνα.

Τέλος, το μέλι αυξάνει το νιτρικό οξύ και επίσης διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων, γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγεί κάποιες από τις ιδιότητες του μελιού που έχουν αναφερθεί παραπάνω (Al-Waili and Haq, 2004; Al-Waili, 2005; Al-Waili and Boni, 2004). Η αλληλεπίδραση του νιτρικού οξέος με διάφορα συστατικά του μελιού μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς δράσης του.

Γενικά το μέλι καταπολεμά τα βακτήρια, τόσο με άμεσους όσο και με έμμεσους τρόπους. Οι άμεσοι τρόποι βασίζονται στην απευθείας αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων, ενώ οι έμμεσοι τρόποι επάγουν τη χρήση του συνόλου των συστατικών του μελιού για να επιφέρουν μια συνεργιστική αντιμικροβιακή δράση.

Συνεπώς μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι το μέλι που περιέχει περισσότερα από ένα ενεργά συστατικά παρουσιάζει και μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Η συνεργεία ανάμεσα στα ενεργά συστατικά του είναι απαραίτητοι για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης, ώστε να έχουμε μια ευρύτερη και πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το πώς τα τόσα πολλά και διαφορετικά συστατικά του, συνεργούν και δίνουν τα εκπληκτικά αυτά αποτελέσματα. Είναι εμφανές ότι το μέλι παρουσιάζει μεγάλη αντιμικροβιακή δραστηριότητα, ανεξαρτήτως από την γεωγραφική και βοτανολογική του προέλευση και έχει ισχυρή δράση εναντίον σε βακτήρια ανθεκτικά ακόμα και σε πολλά αντιβιοτικά. Αυτό θα ανοίξει το δρόμο για να βρεθούν τρόποι απομόνωσης των πιο σημαντικών συστατικών του μελιού και τη αξιοποίησή τους ως φάρμακα στο μέλλον.

1.3 Μέλι Manuka και άλλα είδη μελιών

Το μέλι Manuka προέρχεται από το νέκταρ που συλλέγουν μέλισσες του είδους *Apis mellifera* κατά την αναζήτηση της τροφής τους σε ένα θάμνο γνωστό ως Manuka (*Leptospermum scoparium*) που είναι γηγενής στη Νέα Ζηλανδία. (Hayashi et al., 2014). Είναι αξιοσημείωτο ότι το μέλι Manuka εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μέθυλ-γλυοξάλης σε σχέση με άλλα τρόφιμα, σε τιμές μη συγκρίσιμες. (Mavric et al., 2008). Μικρές ποσότητες ενζυματικώς σχηματιζόμενης γλυοξάλης και μέθυλ-γλυοξάλης, έχουν βρεθεί σε τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση, όπως προϊόντα του γάλακτος, το κρασί και η μπύρα, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 3 έως 11 mg/kg (Bednarski et al., 1989; De Revel and Bertrand, 1993). Επίσης, η μέθυλ-γλυοξάλη σχηματίζεται κατά το καβούρδισμα του καφέ σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 23-47 mg/kg (Hayashi and Shibamoto, 1985). Το πανεπιστήμιο του Waikato στο Χάμιλτον της Ν. Ζηλανδίας ήταν αυτό που μελέτησε πρώτο τη σύνθεση του μελιού Manuka και την αντιμικροβιακή του δράση (Roberts et al., 2015). Πλέον η μέθυλ-γλυοξάλη (MGO) αναγράφεται στην συσκευασία του μελιού Manuka. Για παράδειγμα, MGO 100 σημαίνει ότι 100 mg μεθυλ-γλυοξάλης περιέχονται σε 1Kg μελιού (Sherlock et al., 2010).

Η μοντέρνα ιατρική ανέπτυξε μια σχολαστική μέθοδο για να μετράει την αντισηπτική του ισχύ, το Unique Manuka Factor (UMF). Η μονάδα μέτρησης UMF κατηγοριοποιεί το μέλι με βάση την αντιμικροβιακή του ισχύ. Κάθε παρτίδα ελέγχεται συστηματικά από εγκεκριμένο εργαστήριο, και ταξινομείται κατά αύξουσα σειρά αποδοτικότητας σε κλίμακα από το 0 ως και το 25. Όσο πιο υψηλά ταξινομείται στην κλίμακα, τόσο πιο μεγάλη είναι η αντισηπτική δράση του. Η UMF είναι η μοναδική αξιόπιστη μονάδα μέτρησης αποδοτικότητας του μελιού Manuka και έχει προκύψει από την σύγκριση της αντισηπτικής δράσης του με αυτή του διαλύματος καρβοξυλικού οξέως (πανίσχυρο αντισηπτικό μόριο το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην μοντέρνα ιατρική).

Μέλια τα οποία εμφανίζουν αντιμικροβιακή δραστικότητα που δεν σχετίζεται με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, γενικά προέρχονται από πολλές ποικιλίες λουλουδιών, και κυρίως από λουλούδια του είδους *Leptospermum*. Αυτός είναι και ο λόγος που το μέλι Manuka εμφανίζει αντιμικροβιακό χαρακτήρα που δεν προέρχεται από τη δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς αυτό δεν εμφανίζεται στο μέλι σε ποσότητες που να δικαιολογούν την τόσο καλή αντιμικροβιακή δραστικότητα του. Το μέλι Manuka είναι δραστικό ενάντια σε ένα πλήθος βακτηρίων, όπως το *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) και το *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) καθιστώντας το ως ένα λειτουργικό τρόφιμο για τη θεραπεία στομαχικών ελκών (French et al., 2005). Έρευνες έχουν αποδείξει ότι είναι αποτελεσματικό στην καταπολέμηση παθογόνων βακτηρίων όπως *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella aureus* (Lusby et al., 2005; Visavadia et al., 2006). Επίσης έχει τη δυνατότητα καταπολέμησης βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιβιοτικά, όπως το ανθεκτικό σε μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA), β - αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους και ανθεκτικούς στην βανκομυκίνη εντερόκοκκους (VRE) (Allen et al., 2000; Kingsley, 2001).

Ωστόσο, προσφάτως αναγνωρισμένα για τη δραστικότητα τους μέλια εμφανίζουν πλεονεκτήματα και ομοιότητες με το μέλι Manuka εξαιτίας της ενισχυμένης

αντιμικροβιακής ικανότητας τους. Η τοπική παραγωγή τους και συνεπώς διαθεσιμότητα τους, και φυσικά η μεγαλύτερη εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν ενάντια σε ιατρικά σημαντικούς μικροοργανισμούς τα καθιστούν ιδανικά για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων (Lusby et al., 2005). Οι θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού Medihoney, το οποίο χρησιμοποιείται για θεραπεία πληγών του δέρματος, και είναι ένα παρασκεύασμα από μέλια προερχόμενα από το φυτό *Leptospermum*, μπορεί να οφείλονται στην μεγάλη συγκέντρωση της μέθυλ-γλυοξάλης (Simon et al., 2006), καθώς εμπορικά διαθέσιμα δείγματα του αντιβακτηριδιακού επιθέματος αυτού περιείχαν έως και 312 mg/kg μέθυλ-γλυοξάλης (Mavric et al., 2008). Αυτή η συγκέντρωση είναι ικανή να προκαλέσει αντιμικροβιακά αποτελέσματα όπως αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων ή ακόμα και θάνατο, όταν εφαρμόζεται σε πληγές. Οι αρνητικοί στη κοαγκουλάση σταφυλόκοκκοι έχουν πολλές ομοιότητες με τη *S. aureus* (Cooper et al., 2002; Abhishek et al., 2010) στα επίπεδα ευαισθησίας σε μέλια με παρόμοια αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα, και είναι περισσότερο ευαίσθητα ακόμα και από τη *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) και μερικά είδη εντερόκοκκου (Cooper et al., 2002).

Το μέλι Revamil source (RS) (ιατρικού τύπου), το οποίο παράγεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε θερμοκήπια (Kwakman et al., 2010, Kwakman et al., 2011) περιλαμβάνει 333g/kg γλυκόζη, 385 g/kg φρουκτόζη, 73 g/kg σουκρόζη και 62 g/kg μαλτόζη (Kwakman et al., 2010). Οι παράγοντες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αντιμικροβιακή του δράση είναι η υψηλή συγκέντρωση σε σάκχαρα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η μεθυλ-γλυοξάλη, το χαμηλό pH και το αντιμικροβιακό πεπτίδιο αμυντοσύνη-1 (Kwakman et al., 2010, Kwakman et al., 2011).

Ένα μέλι με μεγάλη αντιμικροβιακή δραστηριότητα είναι το μέλι, το οποίο προέρχεται από το φυτό *Ulmo – Eucryphia cordifolia* και είναι ένα γηγενές φυτό της Χιλής. Ο Sherlock και οι συνεργάτες του έχουν αποδείξει ότι η αντιμικροβιακή του ικανότητα οφείλεται στο ενδογενές υπεροξείδιο του υδρογόνου που εμφανίζει. Έχει γίνει σύγκριση του μελιού *Ulmo* με το μέλι *Manuka* και έχει διαπιστωθεί ότι και τα δυο μέλια είναι εξίσου ικανά στην αναστολή της ανάπτυξης συγκεκριμένων στελεχών βακτηρίων (Sherlock et al., 2010).

Τέλος, το Μαλαισιανό μέλι *Tualang* που συλλέγεται από τα παράλια της Ασίας και παράγεται από τις μέλισσες του είδους *Apis dorsata*, οι οποίες χτίζουν τις κυψέλες τους ψηλά στα δέντρα *Tualang (Koompassia excelsa)*, παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Το *Tualang* είναι αποτελεσματικότερο έναντι των βακτηρίων *S. pyogenes*, *MRSA*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *S. flexneri*, *E. Coli* και *E. cloacae* σε σχέση με το *Manuka*, ενώ παρουσιάζει παρόμοια αντιμικροβιακή δράση με αυτό ενάντια στα βακτήρια *S. typhi* και *P. aeruginosa* (Tan et al., 2009).

1.4 Ενζυμα του μελιού

Στο μέλι έχει ταυτοποιηθεί πλήθος ενζύμων, με τα σημαντικότερα να είναι η ιμπερτάση, η οξειδάση της γλυκόζης και η καταλάση, τα οποία είναι υπεύθυνα για ποικίλες και σημαντικές διεργασίες, συνεισφέροντας στην δραστικότητα του μελιού, τόσο σε διατροφικό όσο και σε αντιμικροβιακό επίπεδο. Το ένζυμο ιμπερτάση διασπά τη σουκρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη με αποτέλεσμα να αυξάνεται η περιεκτικότητα του μελιού σε απλά σάκχαρα. Η οξειδάση της γλυκόζης, ένα από τα ένζυμα που μεταβολίζουν σάκχαρα προστίθεται στο νέκταρ από τις μέλισσες κατά τη συλλογή του, και μετατρέπει τη γλυκόζη σε υπεροξειδίο του υδρογόνου και γλυκονικό οξύ κάτω από αερόβιες συνθήκες (White et al., 1963; Bang et al., 2003). Οι καταλάσες έχουν προέλευση από τη γύρη και υδρολύουν αποτελεσματικά το υπεροξειδίο του υδρογόνου, εξαιτίας της μεγάλης τάσης του να διασπάται ως ασταθές μόριο, σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Η συνολική συγκέντρωση της καταλάσης στο μέλι εξαρτάται από τον αριθμό των κόκκων γύρης (Weston, 2000).

Η οξειδάση της γλυκόζης (FAD οξειδοαναγωγή, EC 1.1.3.4) είναι ένα 85-kDa ένζυμο το οποίο εκφράζεται στον αδένα του υποφάρυγγα των μελισσών, τόσο αυτών που είναι υπεύθυνες για τη συλλογή του νέκταρ, όσο και αυτών που κατεργάζονται το νέκταρ για την παραγωγή του μελιού στην κυψέλη. Έχει αποδειχθεί ότι η οξειδάση της γλυκόζης, εκφράζεται συστηματικά και μόνο από τον αδένα του υποφάρυγγα των μελισσών εργατριών καθώς εκτελούν τα καθήκοντα τους (Bucekova et al., 2014; Ohashi et al. 1999). Η μικρότερη έκφραση παρατηρείται στις μέλισσες που έχουν ως καθήκον τον καθαρισμό (Li et al. 2008; Santos et al. 2005), ενώ η μεγίστη και αρκετά μεγάλη έκφραση παρατηρείται στις μέλισσες επωμισμένες με την επεξεργασία του μελιού και τις μέλισσες υπεύθυνες για τη συγκομιδή αντίστοιχα, καθώς και οι δυο εκκρίνουν οξειδάση στο νέκταρ κατά τη διάρκεια μετατροπής του προς μέλι (Bucekova et al., 2014; Liu et al. 2011). Η έκφραση αυτή δεν εμφανίζεται στις πιο μικρές σε ηλικία μέλισσες υπεύθυνες για τη φροντίδα της κυψέλης (Ohashi et al. 1999). Σε αντίθεση όμως έχει αποδειχτεί ότι η οξειδάση της γλυκόζης εκφράζεται στον αδένα του υποφάρυγγα των μελισσών οι οποίες εργάζονται το χειμώνα (Li et al. 2008; Santos et al. 2005). Συνεπώς, η οξειδάση εκκρίνεται από τις μέλισσες που φροντίζουν την κυψέλη στο ζελέ για την τροφή των προνυμφών, ενώ από τις μέλισσες που επεξεργάζονται το μέλι και από αυτές του κάνουν τη συγκομιδή του νέκταρ, εκκρίνεται στο ίδιο το μέλι (Bucekova et al., 2014). Η οξειδάση εκκρίνεται στο νέκταρ και στη τροφή των προνυμφών όπου δρα ως ένα παράγοντας



αποστείρωσης. Με αυτό τον τρόπο, η οξειδάση της γλυκόζης παρέχει ανοσολογική προστασία στο σύνολο της κυψέλης, και επίσης εμποδίζει την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών οι οποίες προσβάλλουν τις προνύμφες (Yang and Cox-Foster 2005). Το επίπεδο συγκέντρωσης του ενζύμου μπορεί να είναι ένας από τους συντελεστές υπεύθυνους για την παρεμπόδιση ανάπτυξης βακτηριακών και μυκητιακών μολύνσεων στην αποικία, καθώς επίσης να αποτελεί και ένα μέσο/δείκτη για τη συλλογή μελιών με μεγάλη αντιβακτηριδιακή ικανότητα.

Διαφορές στην περιεκτικότητα της οξειδάσης της γλυκόζης σημειώνονται τόσο σε μέλια ίδιας όσο και διαφορετικής βοτανολογικής προέλευσης. Οι διαφορές αυτές παρατηρήθηκαν ανάμεσα και σε μέλια διαφορετικών γεωγραφικών προελεύσεων και περιόδων συγκομιδής (Bucekova et al., 2014). Επιπλέον, η οξειδάση της γλυκόζης είναι ένα συστατικό που απαντάται φυσικώς στο μέλι, τα επίπεδα και η ενζυμική δραστηριότητα της οποίας, καθορίζονται ως η παραγωγή του ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου σε διαλυμένο μέλι και διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα είδη μελιών (Bucekova et al., 2014).

Το περιεχόμενο σε οξειδάση είναι διαφορετικό μεταξύ μελιών διαφορετικής βοτανολογικής προέλευσης, αλλά επίσης και διαφορετικό σε μέλια ίδιας βοτανολογικής προέλευσης, αλλά διαφορετικής γεωγραφικής. Πολύ ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το μέγιστο ποσοστό οξειδάσης έχει βρεθεί σε μέλι το οποίο είναι απροσδιόριστος και πολλαπλής βοτανολογικής προέλευσης (Bucekova et al., 2014), και αυτό πολύ πιθανό να οφείλεται στη διατροφή με γύρη που έχει η αποικία των μελισσών. Η διατροφή με γύρη, προερχόμενη από πολλά διαφορετικά είδη φυτών, έχει αποδειχθεί ότι προσφέρει ενδυνάμωση στο ανοσοποιητικό σύστημα των μελισσών, σε αντίθεση με δίαιτες πλούσιες σε γύρη ενός μόνο είδους φυτού, υποδηλώνοντας ότι η ποικιλία στους διαιτητικούς πόρους των μελισσών, μπορεί να έχει άμεση επίδραση στην έκφραση ανοσοποιητικών και αντιβακτηριδιακών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης και της οξειδάσης της γλυκόζης (Alaux et al. 2010). Αφετέρου, η συγκέντρωση της οξειδάσης στο μέλι μπορεί να συσχετίζεται με την γενετική ποικιλομορφία των μελισσών (διαφορετικοί γενότυποι), καθώς γνωρίζουμε ότι οι συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού πεπτιδίου αμυντοσύνη-1 της μέλισσας διαφέρουν στο ζελέ για την τροφή των προνυμφών και των δειγμάτων μελιού, λόγω της διαφορετικής έκφρασης του πεπτιδίου που καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες (Klaudiny et al. 2012; Majtan et al. 2012). Διαφορές στην ποσότητα της βασικής πρωτεΐνης βασιλικού πολτού-1 σε διάφορα μέλια έχουν παρατηρηθεί (Bilikova and Simuth 2010). Είναι πολύ πιθανόν ότι τα επίπεδα πρωτεϊνών του μελιού που προέρχονται από τις μέλισσες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που έχουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα (όπως η οξειδάση της γλυκόζης), να επηρεάζονται από γενετικούς/επιγενετικούς παράγοντες.

Η διάλυση του μελιού σε νερό, ενεργοποιεί την οξειδάση του υδρογόνου, όμως κάποια μέλια όπως το Manuka δεν είναι ικανά να σχηματίσουν υπεροξείδιο ακόμα και σε μεγάλες διαλύσεις (Kwakman et al. 2011). Ο λόγος είναι ότι, η μέθυλ-γλυοξάλη, ένας αντιβακτηριδιακός παράγοντας, που βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο μέλι Manuka, επιφέρει τροποποιήσεις σε σημαντικά συστατικά πρωτεϊνικής φύσεως, όπως η οξειδάση της γλυκόζης και η αμυντοσύνη-1,

καθιστώντας τες μερικώς ή και ολικώς ανενεργές (Majtan et al. 2014; Majtan et al. 2012).

Οι μελέτες για τη συσχέτιση της ακριβής ποσότητας του ενδογενούς υπεροξειδίου και της επίδρασης της στην αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα των μελιών είναι λίγες (Brudzynski 2006; Chen et al. 2012). Ωστόσο έχει αποδεδειχθεί γενικά ότι μέλια με μεγάλη συγκέντρωση υπεροξειδίου εμφανίζουν βακτηριοκτόνο δράση εναντίον σε μια πληθώρα βακτηρίων όπως Gram-αρνητικά *Escherichia coli*, Gram-θετικά *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* και *P. aeruginosa* (Brudzynski 2006; Chen et al. 2012). Η βακτηριοκτόνος δράση του μελιού συνδέεται άρρηκτα με την συγκέντρωση του ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αυτό.

Κάποια δείγματα μελιού μελιτώματος, εμφανίζουν ικανοποιητική συγκέντρωση υπεροξειδίου χωρίς όμως αυτή να ανταποκρίνεται στην ποσότητα (μικρή) της οξειδάσης της γλυκόζης (Bucekova et al., 2014). Το μέλι από μελίτωμα είναι γνωστό για την μεγάλη συγκέντρωση που εμφανίζει σε φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή, τα οποία παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές και οξειδωτικές ιδιότητες (Alvarez-Suarez et al. 2013). Με την παρουσία μεταβατικών μετάλλων, οι πολυφαινόλες έχουν συσχετιστεί με την σημαντική παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Akagawa et al. 2003; Long et al. 2010). Συνεπώς, συγκεκριμένες πολυφαινόλες φυτικής προέλευσης μπορούν να αποτελέσουν μια επιπρόσθετη πηγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, εξηγώντας το γεγονός της ύπαρξης μεγάλης ποσότητας υπεροξειδίου, αλλά όχι οξειδάσης της γλυκόζης, καθιστώντας ταυτόχρονα το μέλι από μελίτωμα ιδανικό υποψήφιο για κλινικές μελέτες (Cernak et al. 2012; Vlcekova et al. 2012).

Τέλος, γενικά μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η οξειδάση της γλυκόζης εκκρίνεται από τον αδένά του υποφάρυγγα και διαφέρει ποσοτικά μεταξύ διαφορετικών ειδών μελιών. Η έκφραση της οξειδάσης φαίνεται να αυξάνεται σταδιακά στον αδένά, καθώς αυξάνεται η ηλικία των μελισσών εργατριών, με τα μεγαλύτερα επίπεδα έκκρισης να εμφανίζονται στις εργάτριες που επεξεργάζονται το νέκταρ για παραγωγή μελιού. Η συγκέντρωση της οξειδάσης είναι απολύτως ανάλογη της παραγωγής του ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου και μπορούμε συνεπώς να συμπεράνουμε ότι η οξειδάση επηρεάζει τη αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα του μελιού. Γενετικοί παράγοντες παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην έκφραση της οξειδάσης της γλυκόζης, καθώς παρατηρούνται διαφορές στο μέλι και στην τροφή των προνυμφών. Αυτό το γεγονός μπορεί να αποτελέσει εφελκτήριο για την ανατροφή ειδών μελισσών που παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες οξειδάσης, με σκοπό την επίτευξη μεγαλύτερης προστασίας των αποικιών από βακτηριακές επιδημίες, που συχνά απαντώνται στη φύση.

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη συγκέντρωση του ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να είναι οι καταλάσεις, ενζυμα τα οποία υδρολύουν το υπεροξείδιο σε οξυγόνο και νερό. Αν και η συγκέντρωση της καταλάσης στο μέλι εξαρτάται από τον αριθμό και το μέγεθος των κόκκων γύρης (Weston, 2000) στο μέλι δεν υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία για την ακριβή συγκέντρωση της καταλάσης σε αυτό. Επιπλέον η ποσότητα καταλάσης που χρειάζεται για να καταστρέψει τη αντιβακτηριδιακή ικανότητα του μελιού έχει βρεθεί να είναι απροσδόκητα μεγάλη (White et al. 1963). Η συσχέτιση της ποσότητας της οξειδάσης της γλυκόζης και της παράγωγης ενδογενούς υπεροξειδίου είναι πολύ μεγάλη (Bucekova et al., 2014), συνεπώς, η καταλάση (αν

υπάρχει) στο μέλι δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι, οι υπεροξειδάσες είναι ένα από τα ένζυμα που απαντώνται σε αφθονία στο νέκταρ πετούνιας και η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο νέκταρ καπνού και πετούνιας είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ενζυμική δραστηριότητα της υπεροξειδάσης που συναντάται στα δυο είδη νέκταρ (Gonzalez-Teuber et al., 2009; Hillwig et al., 2011). Είναι συνεπώς πολύ πιθανό υπεροξειδάσες προερχόμενες από νέκταρ, και όχι καταλάσες, να είναι υπεύθυνες για την διαφορετική συγκέντρωση του υπεροξειδίου σε διαφορετικά μέλια.

1.5 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γνωστών αντιμικροβιακών συστατικών, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου και η μέθυλ-γλυοξάλη, σε μέλια από τη περιοχή του Όλυμπου διαφόρων φυτικών πηγών. Εξεταστήκαν 21 δείγματα από διάφορες περιοχές του Ολύμπου, ως προς την παράγωγή του ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου και μέθυλ-γλυοξάλης και εξετάστηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση τους στο μέλι. Στην πρώτη πειραματική διαδικασία αναπτύχθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς για το υπεροξειδίο του υδρογόνου, ενώ για την προσδιορισμό της μέθυλ-γλυοξάλης υπολογίστηκε ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του προϊόντος της λάκτο-γλυταθειόνης, που είναι προϊόν της αντίδρασης, και στη συνέχεια μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά τα δείγματα των μελιών, ώστε να ποσοτικοποιηθούν οι συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου και της μέθυλ-γλυοξάλης σε κάθε δείγμα.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Δείγματα μελιού από την περιοχή του Ολύμπου

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν μέλια από την περιοχή του Ολύμπου, τόσο από την κεντρική και ανατολική πλευρά (Καρύα Όλυμπου), όσο και από την δυτική πλευρά και κυρίως στην περιοχή της Θεσσαλίας (Ελασσόνα, Συκέα Ελασσόνας, Κρανιά Ολύμπου και άλλα).

Σύμφωνα με το φορέα διαχείρισης εθνικού δρυμού Ολύμπου, έχουν καταμετρηθεί από επιστήμονες πάνω από 1700 είδη φυτών τα οποία



αντιπροσωπεύουν το 25% της ελληνικής χλωρίδας. Επίσης στη γυμνή από δέντρα αλπική ζώνη υπάρχουν πάνω από 150 είδη φυτών. Σε γενικές γραμμές υπάρχουν τέσσερις ζώνες βλάστησης με πολλές όμως αλληλοδιεισδύσεις ειδών από τη μία στην άλλη, καθώς η βλάστηση του Ολύμπου λόγω του έντονου ανάγλυφου και της μικρής απόστασης από τη θάλασσα καθιστά εύκολη τη δημιουργία πολλών μικροπεριβάλλοντων. Η πρώτη, από τα 300 έως τα 500 μέτρα, που ονομάζεται ζώνη αείφυλλων σκληρόφυλλων, περιλαμβάνει κυρίως θάμνους και δέντρα χαμηλού ύψους όπως την ήμερη

κουμαριά (*Arbutus unedo*), τον κέδρο (*Juniperus oxycedrus*), την αριά (*Quercus ilex*), τη γλυστροκουμαριά (*Arbutus adrachnae*), το πουρνάρι (*Quercus coccifera*), και φυλλοβόλα είδη όπως ο μελιός (*Fraxinus ornus*), το τρίλοβο σφενδάμι (*Acer monspessulanum*), η κουτσουπιά (*Cercis siliquastrum*), η κοκορεβυθιά (*Pistacia terebinthus*), κ.α.

Από τα 600 μέχρι τα 1400 μέτρα, ζώνη των δασών οξιάς – ελάτης και ορεινων κωνοφόρων, συναντούμε κυρίως τη μαύρη πεύκη (*Pinus nigra* var. *Pallasiana*) σε συμπαγείς συστάδες. Σε μικρές ομάδες εμφανίζονται η υβριδογενής ελάτη (*Abies hybridogenus*), η οξυά (*Fagus moesiaca*), σποραδικά η φτελιά (*Ulmus glabra*), ο ίταμος (*Taxus baccata*), η λεπτοκαρυά (*Coryllus avellana*), η κρανιά (*Cornus mas*), η αγριοκερασιά (*Prunus cerasifera*) και μια σημαντική ποικιλία από ποώδη φυτά και πλατάνια (*Platanus orientalis*) και ιτιές (*Salix cinerea*).





Από τα 1400 μέτρα έως τα 2500 μέτρα εμφανίζεται η ζώνη των ψυχρόβιων κωνοφόρων με κυρίαρχο είδος το σπάνιο είδος πεύκης, ρόμπολο (*Pinus heldreichii*), το οποίο κάνει την εμφάνιση του και από το υψόμετρο των 1100 μέτρων, αντικαθιστά βαθμιαία τη μαύρη πεύκη και δημιουργεί αμιγές δάσος σχεδόν μέχρι τα 2000 μέτρα. Η περιοχή που αναπτύσσεται το ρόμπολο είναι συνήθως ξηρή και οι πλαγιές πετρώδεις. Η βλάστηση που

αναπτύσσεται στην περιοχή αυτή είναι προσαρμοσμένη στις ειδικές τοπικές συνθήκες και αντιπροσωπεύεται από χαρακτηριστικούς θάμνους, αγρωστώδη, χαμόφυτα κ.α., ενώ η χλωρίδα περιλαμβάνει πολλά ενδημικά είδη των Βαλκανίων. Πάνω από τα 2500 μέτρα, που αποτελεί και το υψηλότερο δενδροόριο των Βαλκανίων, δεν έχουμε πλέον δάση, αλλά μόνο μια ποικιλία αλπικών οικοσυστημάτων χαμηλής βλάστησης με πολλά όμως σπάνια αγριολούλουδα, από τα οποία τα περισσότερα είναι ενδημικά της ελληνικής και βαλκανικής χλωρίδας.



Τα δείγματα των μελιών που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν ευγενική χορηγία μελισσοκόμων της ευρύτερης περιοχής του Ολύμπου, τοποθετήθηκαν σε γυάλινα βάζα τα οποία φυλάχτηκαν σε δροσερό και σκιερό μέρος.

	ΤΥΠΟΣ	ΗΜ.ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΑΡΑΓΩΓΟΣ
1	Μέλι Ανθέων	Ιούλιος 2013	Καρυά Ολύμπου	Σαμαράς Γεώργιος
2	αγριοτριφύλλι, και μικρά άλλα ετήσια φυτά		Ελασσόνα Ολύμπου	Γκρίγκα Ιωάννα
3	Μέλι ανθέων		Συκεά Ελασσόνας	Σδάνης Γεώργιος, Σδάνης Νικόλαος
4	Μελισσοκομικά φυτά,τριφύλλι, αγροσπαράγκι, κοντορίγανη, λαδανιά, μελιτώματα	30/7/2013	Παλιαμπέλα Βερδικούσιας Λάρισα	Καρκατσέλας Χαράλαμπος
5		Ιούλιος 2013	Δομένικο Ελασσόνας	Τσιτλικιάρης Κων/νος
6		Ιούλιος 2013	Σκαμνιά	Γιούρι Σολκόβσκι
7			Σαραντάπορο	Χατζή Μαρία
8	Αγριοτριφύλλι ,ακακία, θρούμπη, μέντα, βελανιδιά, μελούρα	Ιούνιος-Ιούλιος 2013	Κρανιά Ελασσόνας	Καραλής Νικόλαος
9			Αζωρο Ελασσόνας	Νταλίπη Χρυσούλα, Μπουρονίκος Δημήτριος
10	Μέλι Ανθέων		Βερδικούσια Λαρίσης	Σβαρνάς Αθανάσιος
11			Καλλιθέα Ελασσόνας	Πουρσανίδης, Κουρδή Ουρανία
12		Ιούνιος 2012	Καρυά Ολύμπου	Σαμαράς Γεώργιος
13	Ανθέων και Καστανιάς	2013	Άνω Λεχώνια -Βόλος	Βλάχου Αλεξάνδρα
14	Ανθέων και κωνοφόρων	2012	Δομένικο Ελασσόνας	Ευάγγελος Αθανάσιος, Ζάγκας
15	Ανθέων	Ιούλιος 2014	Καρυά Ολύμπου	Γεώργιος. Σαμαράς
16	Καστανιάς	2012	Θεσσαλία	Νικολούλη Κατερίνα
17	Παλιούρι, Καβαλαριά, αγριοτριφύλλι, αγριοτριανταφυλλιά, αγριοσπάραγκο, πεύκο-καπνός, ακακία, κρινάκια, κιχύριο-φλόμος,	2014	Δρυμός Ελασσόνας	Αργυρόπουλος Ελευθερίου
18	ακακία, τσάι του βουνού, βατομουριές, έλατο	30/8/2014	Καρυά Ολύμπου	Κατσιβελος Γιώργος
19	Άνθη και κωνοφόρα	Αύγουστος 2014	Αζωρος	Νταλίπη Χρυσούλα
20	Ανθέων και κωνοφόρων	2014	Γαλανόβρυση Ελασσόνας	Καρμίρη Αθηνά- Καρετσός Ανδρέας
21	Άνθη και κωνοφόρα	30/7/2014	Καρυά Ολύμπου	Γεώργιος Σαμαράς, επόπτης κέντρου μελισσοκομίας Θεσσαλίας

Πινάκας 2.1 Χαρακτηριστικά Δειγμάτων μελιών του Ολύμπου

2.1.2 Μέλι Manuka

Χρησιμοποιήθηκε μέλι Manuka 550+ και UMF 25+ από την εταιρία Manuka health με έδρα την Νέα Ζηλανδία, το οποίο περιέχει τουλάχιστον 550mg/kg μέθυλ-γλυοξάλης και ανήκει στην κατηγορία super high ως προς την αντιμικροβιακή του δραστηριότητα.



2.1.3 Αντιδραστήρια

➤ Υπεροξείδιο του υδρογόνου

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ISO graded υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% το οποίο το εργαστήριο το προμηθεύτηκε από την εταιρία Merck.

➤ Ο-διανισιδίνη

Η Ο-διανισιδίνη χρησιμοποιείται ως δότης ηλεκτρονίων για τη δράση της υπεροξειδάσης, καθώς το οξειδωμένο προϊόν είναι χρωμοφόρο. Η ποσότητα του χρώματος του προϊόντος μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά, καθώς η οξείδωση της Ο-διανισιδίνης είναι ανάλογη του ρυθμού διάσπασης του υπεροξειδίου από την υπεροξειδάση. Χρησιμοποιήθηκε Ο-Dianisine 98+% από την εταιρία Alfa Aesar.

➤ Υπεροξειδάση

Η υπεροξειδάση είναι το πιο κοινό ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και μέτρηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Είναι ένα ένζυμο το οποίο απαντάται σε μεγάλες ποσότητες σε φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς, αλλά η κύρια πηγή από την οποία απομονώνεται και παράγεται είναι το αγριοράπανι. Αυτό το ένζυμο χρησιμοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου για να οξειδώσει μια μεγάλη γκάμα ανόργανων και οργανικών ενώσεων. Αποτελεί τον κύριο τρόπο ποσοτικοποίησης του υπεροξειδίου καθώς δεν έχουν αναφερθεί χημικοί μέθοδοι ποσοτικοποίησης του υπεροξειδίου, παρόλο που τα καθαρά φυσικά ένζυμα είναι ασταθή και πολύ ακριβά για να παραχθούν. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε Peroxidase from horseradish min. 1000 U/mg από την εταιρία Serva.

➤ Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα

Το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία και βιοχημεία για τη σταθεροποίηση του pH ιδιαίτερα σε διαλύματα ενζύμων. Phosphate, 0.2M buffer pH 6.8 από την εταιρία Alfa Aesar ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα που επιλέχτηκε.

➤ Θειικό οξύ

Για την παύση της αντίδρασης υδρόλυσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου από την υπεροξειδάση χρησιμοποιήθηκε ISO graded Θειικό οξύ 95-97% της εταιρίας Scharlau.

➤ Ανηγμένη γλουταθειόνη

L-Glutathione (reduced form) 97.5% καθαρότητας από την εταιρία Serva χρησιμοποιήθηκε για τη οξείδωση της από την γλυοξαλάση για το πείραμα προσδιορισμού της μέθυλ-γλυοξάλης. Το ένζυμο χρησιμοποιεί αυτή και την μέθυλ-γλυοξάλη για την παράγωγή S-D-λακτο-γλουταθειόνης.

➤ Γλυοξαλάση – I

Glyoxalase I from *Saccharomyces cerevisiae* Grade IV, buffered aqueous glycerol solution, ≥400 units/mg protein της εταιρίας Sigma-Aldrich αποτέλεσε το ένζυμο υπεύθυνο για τον ισομερισμό της γλουταθειόνης με τη μέθυλ-γλυοξάλη.

➤ Μέθυλ-γλυοξάλη

Μέθυλ-γλυοξάλη από την εταιρία Alfa Aesar χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς για εξακρίβωση των αποτελεσμάτων.

2.1.4 Όργανα και Αναλώσιμα

- ✓ Αυτόματες πιπέτες
- ✓ Γυάλινα φιαλίδια
- ✓ Επωαστήρας
- ✓ Θάλαμος επώασης
- ✓ Κωνικές φιάλες
- ✓ Ογκομετρικός κύλινδρος
- ✓ Οικιακό ψυγείο
- ✓ Πιπέτες Pasteur
- ✓ Στατώ Σωληναρίων
- ✓ Υδατόλουτρο
- ✓ Φασματοφωτόμετρο Genesis 10_{uv-visible}
- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Vortex

Αναλώσιμα: Eppendorfs (1.5ml), κυψελίδες, tips

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μέλι

Η συγκέντρωση του υπεροξειδίου στο μέλι προσδιορίστηκε ποσοτικά με την εξής διαδικασία: 120 μl διαλυμάτων μελιού σε απιονισμένο νερό αραιώσης 1:10, αναμιγνύονταν με αντιδραστήριο όγκου 405 μl, αποτελούμενο από 20,25μl O-διανισιδίνης, 0,81μl υπεροξειδάσης και 384μl φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Τα διαλύματα της O-διανισιδίνης και της υπεροξειδάσης παρασκευάστηκαν, η πρώτη διαλύοντας 10mg ουσίας σε 10 ml απιονισμένου νερού, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1mg/ml και η δεύτερη προσθέτοντας 10mg ενζύμου σε 1ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH 6,8, ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 10mg/ml. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37° C, η αντίδραση ερχόταν σε παύση με την προσθήκη 360μl θειικού οξέως συγκεντρώσεως 6M, και ακολουθούσε μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm. Οι μετρήσεις για κάθε μέλι πραγματοποιήθηκαν σε τουλάχιστον δυο ξεχωριστά πειράματα, όπου σε κάθε πείραμα το κάθε μέλι εξετάζονταν εις τριπλούν. Οι συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου των μελιών υπολογίζονταν, χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς διαδοχικών αραιώσεων του υπεροξειδίου με εύρος συγκέντρωσης 2.5-250μM.

2.2.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της μέθυλ-γλυοξάλης στο μέλι

Ανηγγεμένη γλουταθειόνη προστέθηκε σε διαλύματα μελιών διαφορετικών συγκεντρώσεων (πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις σε νερό 1:1, 1:2 και 1:3), σε τελικό όγκο 15mM, και η μετατροπή της μέθυλ-γλυοξάλης σε S-D-λάκτο-γλουταθειόνη ξεκινούσε με την προσθήκη 0,5U/ml γλυοξαλάσης-I. Η ποσότητα της μέθυλ-γλυοξάλης στο δείγμα υπολογίζονταν με τη βοήθεια του συντελεστή μοριακής απόσβεσης της λάκτο-γλουταθειόνης τάξης μεγέθους 3.37 nM^{-1} στα 240 nm. Μετά το πέρας της αντίδρασης με μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στα 240nm η συγκέντρωση της μέθυλ-γλυοξάλης υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$C = \frac{A}{e \times b}$$

Όπου: A η απορρόφηση στα 240nm

e ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης= $3.373.37\text{ nM}^{-1}$

b η απόσταση που διανύει η δέσμη φωτός μέσα στην κυψελίδα=1cm

III. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα προσδιορισμού της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα ελληνικά μέλια

Για την ποσοτικοποίηση του ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου που περιέχεται στα ελληνικά μέλια από την περιοχή του Ολύμπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που ακολούθησαν οι *Kwakman et al.*, 2012. Συνεπώς τα διαλύματα των δειγμάτων των μελιών από περιοχές του Ολύμπου (21 σε αριθμό) υποβλήθηκαν στις συνθήκες που ορίζει το πρωτόκολλο και μετά την αντίδραση με τη υπεροξειδάση φωτομετρήθηκαν τα διαλύματα στα 540nm. Η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του κάθε μελιού εξήχθη από καμπύλη αναφοράς που δημιουργήθηκε με βάση τη χρήση διαλυμάτων υπεροξειδίου του υδρογόνου στο πρωτόκολλο, αφού προηγήθηκε διαδοχική του αραιώση εύρους 2.5-250mM. Από το διάγραμμα 3.1.1 διαφαίνεται ότι με τις διαδοχικές αυτές αραιώσεις πάρθηκαν σχεδόν ιδανικές απορροφήσεις, καθώς παρατηρούμε ότι η γραφική παράσταση εμφανίζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση ($R^2=0,9952$), καθιστώντας την αξιόπιστο οδηγό για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα δείγματα του μελιού.

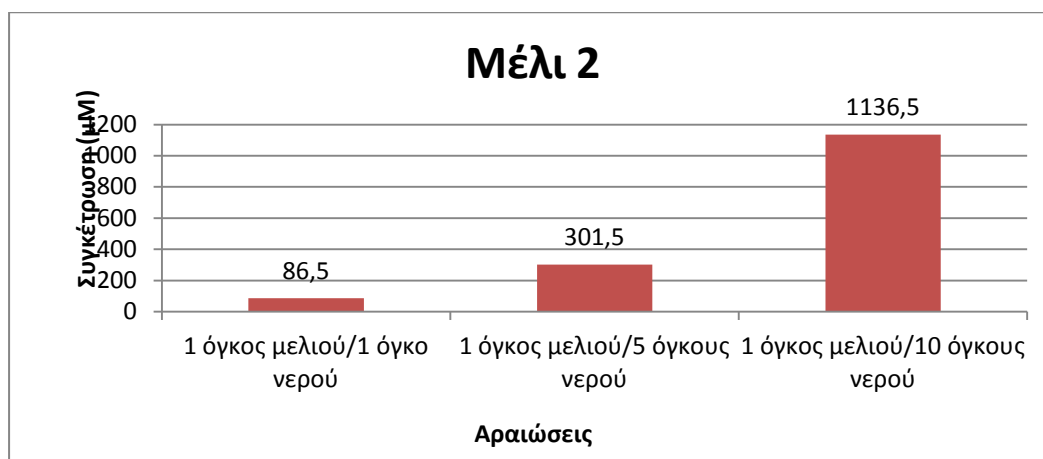


Διάγραμμα 3.1.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δειγμάτων υπεροξειδίου του υδρογόνου

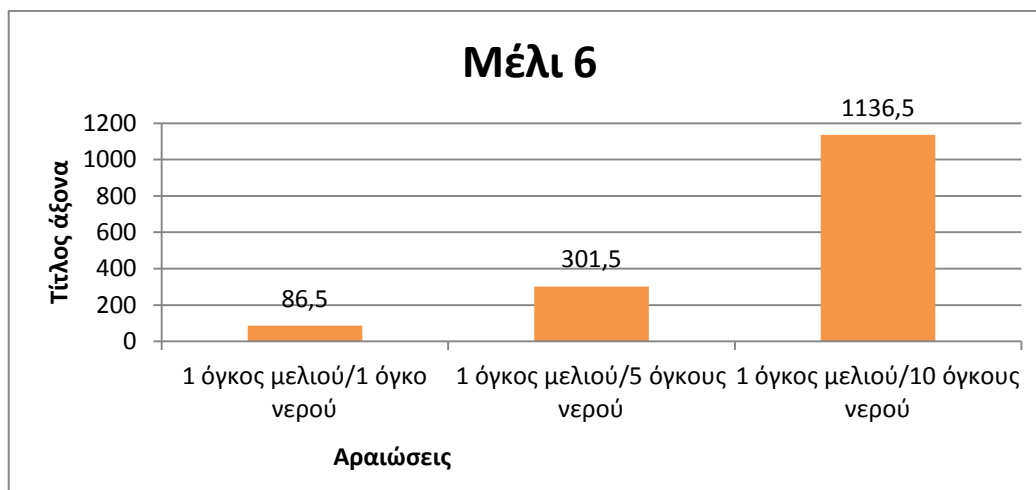
Επίσης έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών του πρωτοκόλλου, καθώς παρατηρήθηκε ότι τα μέλια έδειξαν διαφορετικές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου όταν υπήρχε αλλαγή στις συνθήκες, όπως αραιώση του μελιού, ο χρόνος επώασης των διαλυμάτων πριν την αντίδραση και η διαφορετική θερμοκρασία επώασης, είτε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είτε στους 37°C. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι η οξειδάση της γλυκόζης είναι ανενεργή κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του μελιού. Όταν όμως το μέλι αραιωθεί σε σχετικά μικρές ποσότητες νερού, η οξειδάση ενεργοποιείται και αρχίζει να διασπά τη γλυκόζη προς υπεροξείδιο του υδρογόνου και γλυκονικό οξύ. Το γεγονός αυτό μας ώθησε να αναζητήσουμε τις συνθήκες οι οποίες είναι ιδανικές

για την οξειδάση, ώστε να αποκτήσει τη μέγιστη δραστικότητα της, με συνέπεια να αυξήσει σε μέγιστο δυνατό βαθμό τη συγγένεια με το υπόστρωμα της (γλυκόζη). Δοκιμάστηκαν πολλές αλλαγές στις συνθήκες, όπως αραιώση σε διαφορετικούς όγκους νερού, επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για διάφορα χρονικά διαστήματα, επώαση στους 37 βαθμούς Κελσίου για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις κ.α. Ειδικότερα επιλέχτηκαν 2 δείγματα μελιών (2 και 6) τα οποία επώαστηκαν, αφού είχαν προηγηθεί διαφορετικές αραιώσεις σε νερό (1/1, 1/5 και 1/10), με σκοπό να μπορέσουμε να εξακριβώσουμε τις συνθήκες βέλτιστης αραιώσης.

Διάγραμμα 3.1.2 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διαφορετικές αραιώσεις σε νερό για το μέλι 2



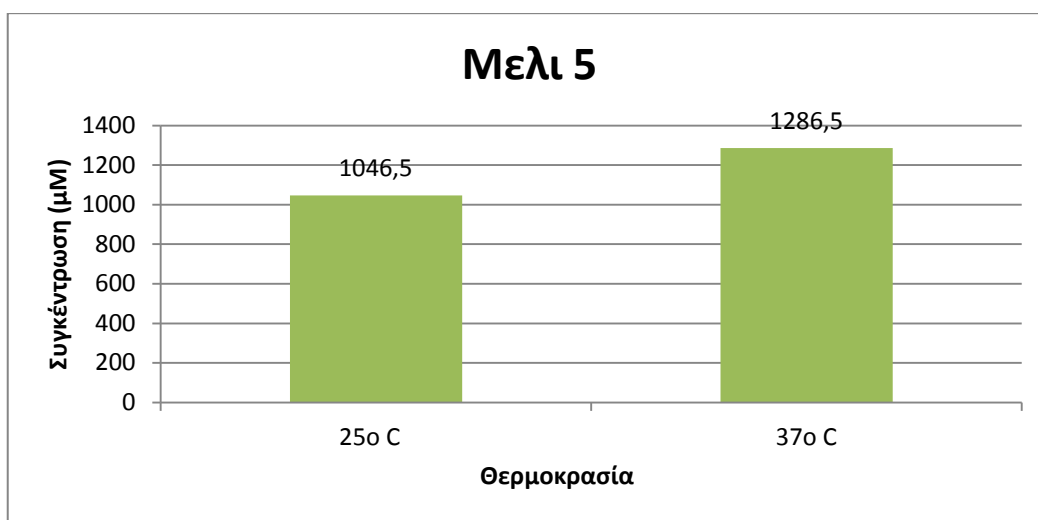
Διάγραμμα 3.1.3 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διαφορετικές αραιώσεις σε νερό για το μέλι 6



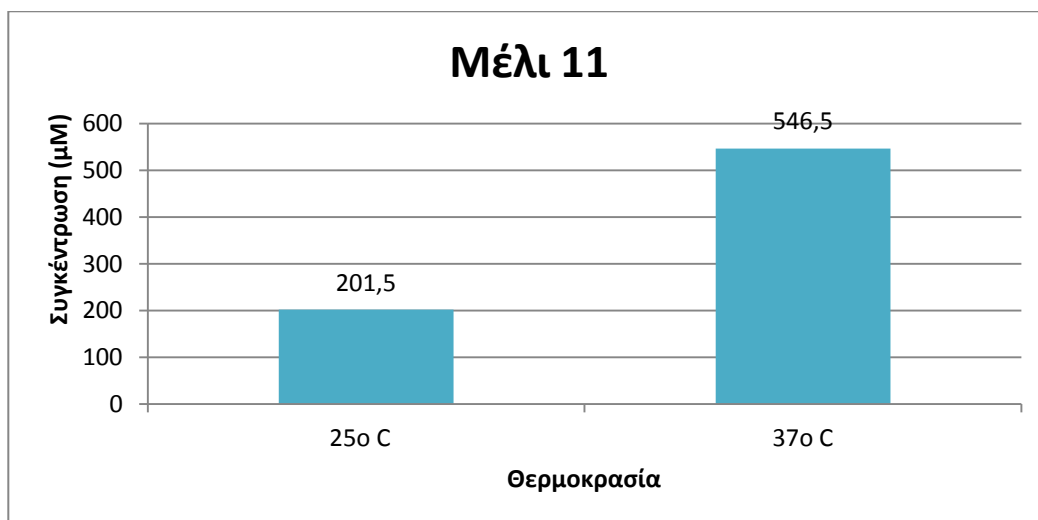
Μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε από τα διαγράμματα 3.1.2 και 3.1.3 ότι η μέγιστη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου επιτυγχάνεται σε αραιώσεις της τάξεως 1/10 και για τα 2 μέλια, συνεπώς μπορούμε να θεωρήσουμε ότι αυτή η συγκέντρωση είναι ιδανική και για τα υπόλοιπα μέλια.

Επίσης, εξετάστηκαν 2 δείγματα μελιών (5 και 11) για να βρεθεί η βέλτιστη θερμοκρασία επώασης τους. Ίδιες αραιώσεις (1/10) μελιών ελεγχτήκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και θερμοκρασία 37°C. Τόσο το μέλι 5 όσο και το μέλι 11 παρουσιάζουν καλύτερη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου όταν επωάζονται στους 37°C, γεγονός που ενισχύεται από το ότι η οξειδάση της γλυκόζης είναι γνωστό ότι εμφανίζει καλύτερη δραστηριότητα στους 37°C. Παρακάτω παρουσιάζονται διαγραμματικά οι συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του κάθε μελιού στις διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης.

Διάγραμμα 3.1.4 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διαφορετικές θερμοκρασίες για το μέλι 5



Διάγραμμα 3.1.5 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διαφορετικές θερμοκρασίες για το μέλι 11



Τελικά παρατηρήθηκε ότι στα περισσότερα μέλια η μέγιστη παραγωγή ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου επιτεύχθηκε σε αραίωση του δείγματος μελιού σε νερό σε λόγο 1:10 και στη συνέχεια η επώαση αυτού στους 37 βαθμούς Κελσίου για τρεις ώρες. Μετά το πέρας των τριών ωρών επώασης ξεκινούσε η αντίδραση (όπως παρουσιάστηκε στο πρωτόκολλο) ενώ σε 5 λεπτά σταματούσε με την προσθήκη πυκνού θειικού οξέως και φωτομετρούνταν. Συνεπώς μετρώντας την απορρόφηση του κάθε μελιού και αντικαθιστώντας την στην καμπύλη αναφοράς μπορέσαμε να μετρήσουμε τη μέγιστη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε και στον πίνακα 3.1.1, κάποια μέλια εμφανίζουν μεγάλες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου, όπως τα 5 και 6, κάποια ικανοποιητικές τιμές όπως τα 1,11 και 17, ενώ τα υπόλοιπα μέλια που μελετηθήκαν παρουσιάζουν σχετικά μικρές έως και καθόλου ενδογενές υπεροξείδιο του υδρογόνου. Τα μέλια 5 και 6 παρουσιάζουν παρόμοιες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου με καναδικά μέλια από σίκαλη τα οποία παρουσιάζουν πολύ καλές αντιμικροβιακές ιδιότητες εναντίον σε *E. Coli* και *B. subtilis*, καθώς επίσης και τα μέλια 1,11 και 17 έχουν ανάλογες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου με καναδικά μέλια από μύρτιλο και μέλια από τριφύλλι, τα οποία εμφανίζουν εξίσου αντιμικροβιακή δραστηριότητα με τα προηγούμενα (Brudzynski et al. 2011).

Πινάκας 3.1.1 Μέγιστη συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM)* στα δείγματα μελιών

Δείγματα μελιών	Συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM)*
1	866,5 \pm 0,28
2	340,1 \pm 0,5
3	30,15 \pm 1,5
4	80,15 \pm 1,4
5	1286,5 \pm 1,2
6	1136,5 \pm 1,04
7	150,6 \pm 1,04
8	26,5 \pm 0,28
9	300,15 \pm 1,6
10	0
11	546,5 \pm 0,76
12	286,5 \pm 1,6
13	336,5 \pm 1,5
14	21,5 \pm 0,57
15	76,5 \pm 0,57
16	0
17	506,5 \pm 1,5
18	21,5 \pm 0,57
19	0
20	16,5 \pm 0,95
21	0

*Οι συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου υπολογίστηκαν ως ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων από δυο τουλάχιστον ξεχωριστά πειράματα, όπου σε κάθε πείραμα το κάθε μέλι εξετάστηκε εις τριπλούν.

Επομένως τα μέλια μπορούν σύμφωνα με τις μετρήσεις για τη μέγιστη συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορούν να καταταχτούν στις 4 παρακάτω κατηγορίες:

- ❖ Μέλια με πολύ καλή παραγωγή ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου με τιμές πάνω από 1000 μM , τα δείγματα 5 και 6.
- ❖ Μέλια με μέτρια παραγωγή ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου με τιμές από 500 έως 866 μM , τα οποία είναι τα δείγματα 1,11,17.
- ❖ Μέλια με μικρή παραγωγή ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου με τιμές από 16 έως 340 μM , τα δείγματα 2,3,4,7,8,12,13,14,15,18,20
- ❖ Μέλια με μηδενική παραγωγή ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου με τιμές μηδενικές η μη ανιχνεύσιμες και είναι τα δείγματα 10,16,21

Επίσης έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης του προτεινόμενου πρωτοκόλλου, ώστε να μπορέσουμε να παρακολουθήσουμε το ρυθμό παράγωγης του υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την πάροδο του χρόνου. Επιλέχθηκαν δείγματα μελιών που παρουσίασαν καλή, μέτρια και μικρή συγκέντρωση υπεροξειδίου (τα δείγματα 5 και 6 καλή, 1 και 11 μέτρια, 2 μικρή) και πραγματοποιήθηκαν σειρές μετρήσεων στο κάθε μέλι, αφού το καθένα διαλύθηκε στο νερό και επώαστηκε στους 37 βαθμούς κελσίου για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα. Πρώτα επιλέχτηκε να μην γίνει επώαση των δειγμάτων και αφού γινόταν η διάλυση στο νερό τα υποβάλαμε κατευθείαν στην αντίδραση και σε μέτρηση της απορρόφησης. Εν συνεχεία κάθε δείγμα επώαζονταν για 1,2,3,4,12 και 24 ώρες και υποβάλλονταν στην αντίδραση μετρώντας ακολούθως την απορρόφηση. Με αυτό τον τρόπο μπορέσαμε να παρακολουθήσουμε την παραγωγή του υπεροξειδίου στα επιλεγμένα δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια μιας μέρας με σκοπό να ελεγχθεί ο ρυθμός παραγωγής του και να διευκρινιστεί το μέγιστο παραγωγής του. Εξήχθησαν συμπεράσματα για το χρονικό διάστημα στο οποίο το υπεροξείδιο του υδρογόνου παραμένει στο μέλι από τη στιγμή που αυτό θα διαλυθεί σε νερό και συνεπώς θα αρχίσει η παραγωγή του υπεροξειδίου.

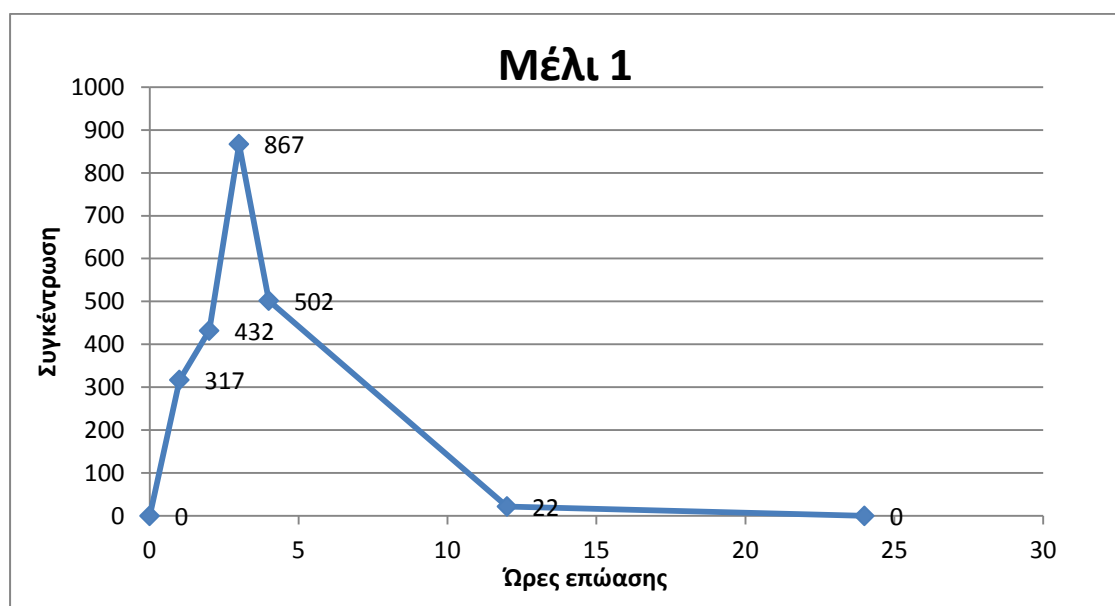
Όπως παρατηρείται από τον πίνακα 3.1.2 τα μέγιστα παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου παρατηρούνται τόσο για τα μέλια με καλή όσο και για αυτά με μέτρια παραγωγή στις τρεις ώρες, ενώ για το μέλι 2, το οποίο παρουσιάζει μικρή παραγωγή, στη μια ώρα. Για την πρώτη κατηγορία μελιών όπου το μέγιστο παρατηρείται στις τρεις ώρες μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε ότι έχουν μια σχετικά γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, όπου μετά το πέρας των τριών ωρών σταδιακά η συγκέντρωση πέφτει και στο τέλος της μέρας (24ωρες διάλυσης) η συγκέντρωση φτάνει μηδενικά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Ωστόσο για το μέλι 2, το οποίο παρουσιάζει μικρή παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου σε σχέση με τα άλλα μέλια, παρατηρούμε ότι παρουσιάζει μέγιστο στη μια ώρα και μετά την πάροδο του χρονικού διαστήματος αυτού αρχίζει η πτωτική πορεία της συγκέντρωσης μέχρι τις 12 ώρες, όπου το υπεροξείδιο δεν είναι ανιχνεύσιμο. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτή η διαφοροποίηση ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι ο ρυθμός παραγωγής του υπεροξειδίου από την οξειδάση της γλυκόζης είναι μικρότερος από το ρυθμό διάσπασης του υπεροξειδίου μετά από τη μια ώρα, αλλά αυτή η υπόθεση μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνο με μελέτες κινητικής του ενζύμου.

Πίνακας 3.1.2 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) σε διάφορα χρονικά διαστήματα επώασης στους 37°C , για τα δείγματα 1,2,5,6,11

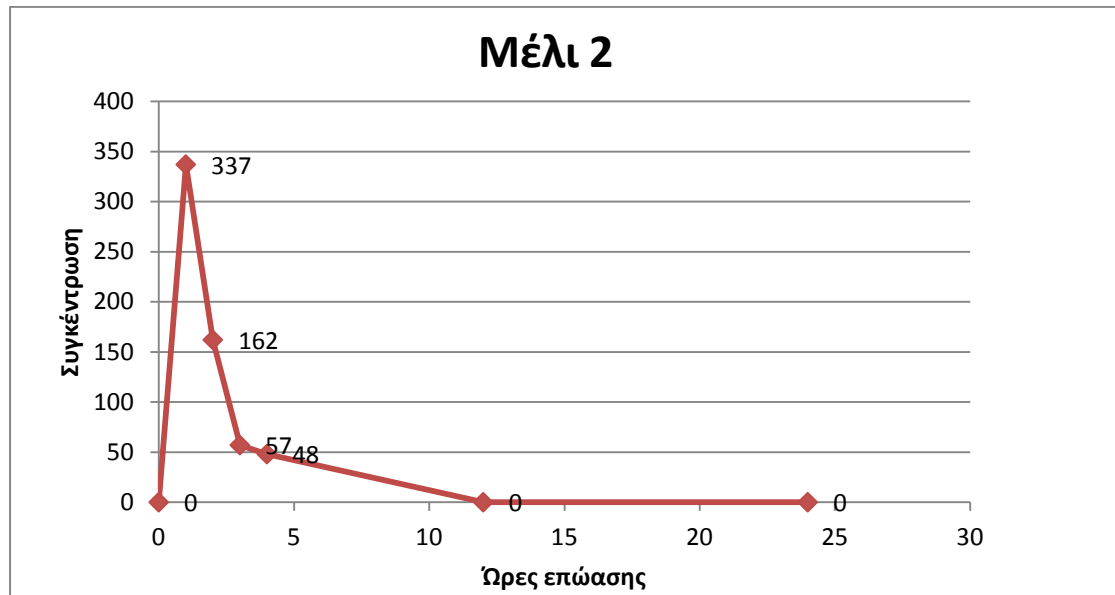
Ώρες επώασης	Μέλια				
	1	2	5	6	11
0	0	0	102	0	0
1	317	337	1077	332	482
2	432	162	1152	462	512
3	867	57	1281	1131	547
4	502	48	1070	732	462
12	22	0	40	45	32
24	0	0	0	24	0

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα των συγκεντρώσεων των επιλεγμένων μελιών κατά τη διάρκεια της παρόδου ενός εικοσιτετραώρου, όπου φαίνονται πολύ καθαρά τα μέγιστα των συγκεντρώσεων, άλλα και η σχετικά γραμμική αύξηση/μείωση τους.

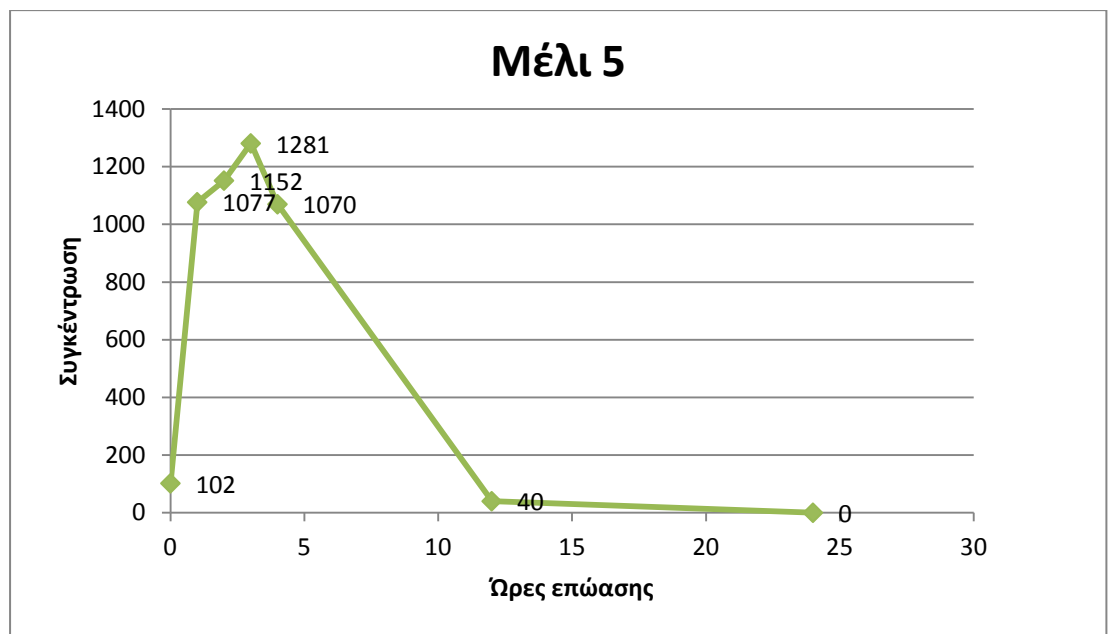
Διάγραμμα 3.1.6 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 1



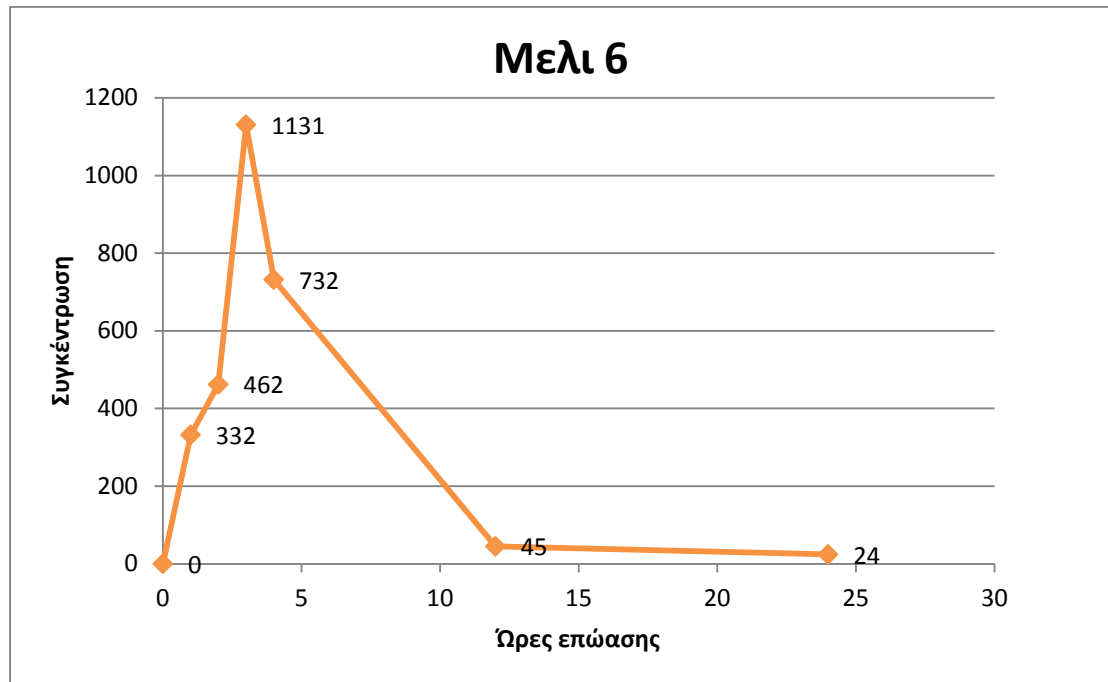
Διάγραμμα 3.1.7 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 2



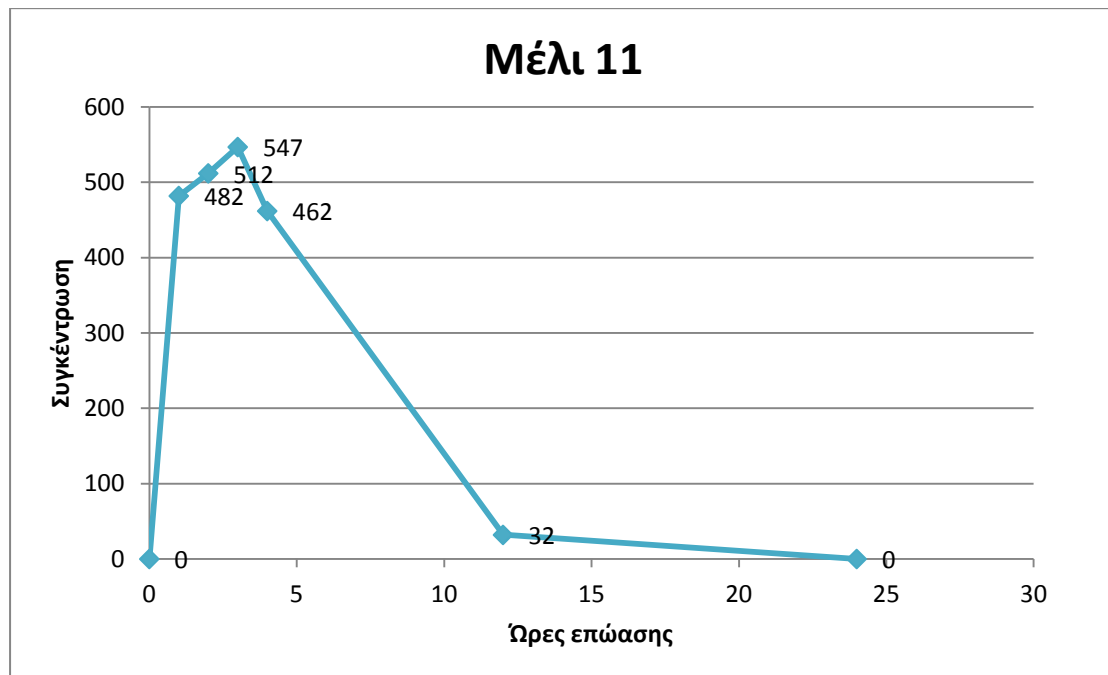
Διάγραμμα 3.1.8 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 5



Διάγραμμα 3.1.9 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 6



Διάγραμμα 3.1.10 Συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (μM) κατά τη διάρκεια μιας ημέρας στο μέλι 11

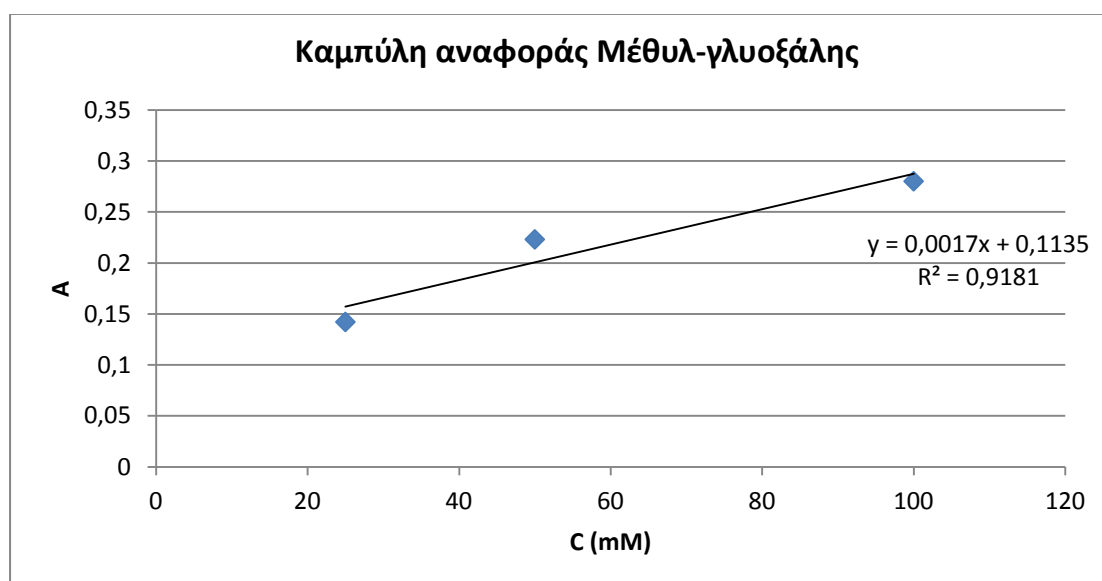


Γίνεται εύκολα κατανοητό από τα παραπάνω διαγράμματα ότι η επώαση βοηθάει την οξειδάση της γλυκόζης να ενεργοποιηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό με την πάροδο του χρόνου. Η μεγίστη συγκέντρωση παρατηρείται στις 3 ώρες και αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτό το σημείο αποτελεί το μέγιστο του ρυθμού παραγωγής του υπεροξειδίου από την οξειδάση, ενώ μετά το πέρας των τριών ωρών, είτε η διάσπαση του υπεροξειδίου ως ασταθές μόριο υπερβαίνει την ικανότητα της οξειδάσης να το παράγει ή η οξειδάση χάνει τη συγγένεια με το υπόστρωμα της (γλυκόζη), καθώς η συγκέντρωσή του μειώνεται.

Το δείγμα 2, που παρουσιάζει μικρότερη συγκέντρωση ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου, εμφανίζει το μέγιστο της συγκέντρωσης στην 1 ώρα επώασης, πράγμα που πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η οξειδάση της γλυκόζης στο δείγμα αυτό απαντάται σε μικρότερη συγκέντρωση, συνεπώς απαιτείται μικρότερος χρόνος για την ενεργοποίησή της. Επίσης άλλος ένας λόγος που εμφανίζεται τόσο γρήγορα το μέγιστο ίσως να οφείλεται στο ότι η οξειδάση της γλυκόζης δεν έχει την ίδια δραστηριότητα με τα άλλα δείγματα, καθώς μπορεί να έχει αλλοιωθεί η δομή της και κατ' επέκταση η αποδοτικότητα της στην παραγωγή του υπεροξειδίου. Μόνο υποθέσεις μπορούμε να κάνουμε για τους λόγους απώλειας της ενεργότητας της οξειδάσης που βρίσκεται στο μέλι, καθώς η μη σωστή αποθήκευση, η λανθασμένη θερμική επεξεργασία, η διατροφή και γενετικοί/επιγενετικοί παράγοντες της μέλισσας μπορούν πολύ εύκολα να επηρεάσουν την δραστηριότητα της οξειδάσης (Bucekova et al., 2014; Alaux et al. 2010).

3.2 Αποτελέσματα του προσδιορισμού της μέθυλ-γλυοξάλης στα ελληνικά μέλια.

Για την ποσοτικοποίηση της μέθυλ-γλυοξάλης του υδρογόνου που περιέχεται στα ελληνικά μέλια από την περιοχή του Ολύμπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που ακολούθησαν οι Kwakman *et al.*, 2012. Συνεπώς τα διαλύματα των δειγμάτων (21 σε αριθμό) υποβλήθηκαν στις συνθήκες που ορίζει το πρωτόκολλο και μετά την αντίδραση με γλυοξαλάση-Ι φωτομετρήθηκαν τα διαλύματα στα 240nm. Η συγκέντρωση της μέθυλ-γλυοξάλης υπολογιζόταν σε κάθε δείγμα μελιού με βοήθεια του νόμου Beer – Lambert. Ως μοριακός συντελεστής απορροφητικότητας χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής απορρόφησης του προϊόντος της αντίδρασης, η S-D-Λάκτο-γλουταθειόνη, η οποία στην αντίδραση παράγεται σε στοιχειομετρία 1:1 με την μέθυλ-γλυοξάλη. Συνεπώς με μέτρηση της απορρόφησης αυτού του προϊόντος στα 240nm μετά το πέρας της αντίδρασης, μπορούμε έμμεσα να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της μέθυλ-γλυοξάλης, βρίσκοντας τη συγκέντρωση της S-D- λάκτο-γλουταθειόνης. Επίσης δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς για την μέθυλ-γλυοξάλη με τη χρήση διαλυμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης μέθυλ-γλυοξάλης (25,50 και 100mM) με σκοπό να βρεθεί η γραμμικότητα της αντίδρασης και παρατηρούμε ότι δεν είναι τόσο καλή όσο η γραμμικότητα που παρατηρούμε στην καμπύλη αναφοράς του υπεροξειδίου.



Διάγραμμα 3.2.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δειγμάτων μέθυλ-γλυοξάλης

Έγινε μέτρηση του μελιού Manuka 550+, το οποίο αναμένεται να έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση μέθυλ-γλυοξάλης από 550mg/kg, και διαπιστώθηκε ότι είχε 676mg/kg μέθυλ-γλυοξάλης. Όμως από τα δείγματα μας κανένα δεν έδειξε ότι περιείχε μέθυλ-γλυοξάλη, καθώς δεν μπορέσαμε να μετρήσουμε απορροφήσεις στα δείγματα, ή τουλάχιστον το επίπεδο ευαισθησίας του φασματοφωτομέτρου δεν ήταν μεγάλο για την ανίχνευση της μέθυλ-γλυοξάλης που τυχόν υπάρχει στα ελληνικά μέλια.

IV. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Το μέλι αποτελεί ένα πολύ σημαντικό φάρμακο και ταυτόχρονα λειτουργικό τρόφιμο γνωστό για τις πολύ καλές αντιμικροβιακές ικανότητες του ιδιαίτερα ενάντια σε βακτήρια ανθεκτικά σε διάφορα είδη αντιβιοτικών (Molan, 1992). Η δράση του ενάντια σε βακτήρια έχει μελετηθεί και γνωρίζουμε ότι πολλά συστατικά του παίζουν ρόλο στην ικανότητα του να τα καταπολεμά και πολλές φορές η δράση των συστατικών του έχουν ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα (Kwakman et al., 2008; Molan, 2006; Cushnie and Lamb, 2005).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου έχει επισημανθεί ως ο σημαντικότερος και πιο κοινός αντιμικροβιακός παράγοντας που απαντάται στο μέλι (White et al., 1993; Kwakman et al., 2010), καθώς η βακτηριοκτόνος ικανότητα του είναι γνωστή και η χρήση του εκτεταμένη στον ιατρικό κλάδο. Η συγκέντρωση του στο μέλι δεν είναι αρκετά μεγάλη για να σκοτώσει τα κύτταρα των βακτηρίων αλλά είναι ικανή να επιδράσει αρνητικά στους μηχανισμούς υπεύθυνους για την ανάπτυξη του βακτηρίου (Brudzynski, 2006), καθώς επίσης όπως έχει τελευταία αποδειχτεί μπορεί και επιδρά άμεσα στο DNA των βακτηρίων συμβάλλοντας στη γρήγορη αποσύνθεση του μέσα στο κύτταρο τους (Brudzynski et al., 2012).

Η μέθυλ-γλυοξάλη είναι μια 1,2-δικαρβονυλική ένωση που απαντάται στο μέλι και ιδιαίτερα σε μέλια τα οποία προέρχονται από το φυτό *Leptospermum scorarium*, χωρίς να είναι γνωστό κατά το πόσο η βοτανολογική προέλευση του μελιού επηρεάζει τα επίπεδα της. Η ουσία αυτή αποτελεί προϊόν αυξημένης γλυκόλυσης στα βακτήρια (Ferguson et al., 1998), αλλά η προέλευση της στο μέλι δεν είναι γνωστή μέχρι σήμερα. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα της μέθυλ-γλυοξάλης είναι αποδεδειγμένη και αποτελεί τον κύριο παράγοντα της βακτηριοκτόνου δράσης του μελιού Manuka (Majtan et al., 2012; Kwakman et al., 2010). Όντας ένα προϊόν γλυκόλυσης (Advanced glycation end product) έχει τη δυνατότητα να συμβάλει στην εμφάνιση επιπλοκών σε διάφορες ασθένειες (Henle, 2005; Henle and Miyata, 2003; Nemet et al., 2006), ωστόσο δεν είναι γνωστή η τοξικότητα της στον διατροφικό τομέα.

Στην εργασία αυτή έγινε προσπάθεια προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της μέθυλ-γλυοξάλης σε μέλια από την ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου. Η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου μετρήθηκε για τα 21 διαθέσιμα δείγματα και τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα ελληνικά μέλια αυτά εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος στη συγκέντρωση του υπεροξειδίου, που κυμαίνεται από αρκετά μεγάλη (1281μM το μέγιστο) έως μηδενική σε κάποια. Τα ελληνικά μέλια τα οποία έχουν πολύ μεγάλη και μέτρια παραγωγή ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου εμφανίζουν παρόμοιες συγκεντρώσεις της ουσίας αυτής με καναδικά μέλια από σίκαλη, μύρτιλο και τριφύλλι τα οποία παρουσιάζουν πάρα πολύ καλές αντιμικροβιακές ιδιότητες και χρησιμοποιούν το υπεροξειδίο ως τον κύριο παράγοντα για την καταπολέμηση των βακτηρίων.

Οι καταλάσες είναι ένζυμα τα οποία απαντώνται στη γύρη των φυτών, αλλά η συγκέντρωσή τους είναι άγνωστη και διαφέρει πολύ μεταξύ γύρεων διαφορετικής φυτικής προέλευσης (Brudzynski et al. 2011). Ταυτόχρονα έχει αποδειχθεί ότι σε

διάφορα είδη φυτών όπως ο καπνός και η πετούνια βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις υπεροξειδάσης, η οποία διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Gonzalez-Teuber et al., 2009; Hillwig et al., 2011). Συνεπώς μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η τόσο μεγάλη διακύμανση της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παρατηρούμε στα δείγματα μας (από 1281μM έως 0μM) ίσως να οφείλεται στη συνεργιστική δράση της καταλάσης και της υπεροξειδάσης, καθώς δεν γνωρίζουμε την φυτική προέλευση σε πολλά δείγματα και δεν έχουμε πραγματοποιήσει μετρήσεις για την συγκέντρωση των δυο αυτών ένζυμων στα δείγματα αυτά.

Είναι γνωστό ότι η βοτανολογική προέλευση του μελιού έχει πολύ μεγάλη επίδραση στη συγκέντρωση της οξειδάσης της γλυκόζης στο μέλι (Bucekova et al., 2014). Συνεπώς, μέλια διαφορετικής βοτανολογικής πηγής θα έχουν διακυμάνσεις στην οξειδάση της γλυκόζης, άρα και κατ' επέκταση στην παραγωγή ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν το ίδιο καθώς υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη βοτανολογική προέλευση των 21 δειγμάτων τα οποία έχουν μελετηθεί, και οι συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου διαφέρουν σε πολύ μεγάλο βαθμό ανάμεσα σε μέλια όπου η πηγή του νέκταρ διαφέρει πολύ. Επίσης μέλια τα οποία έχουν άγνωστη βοτανολογική προέλευση αλλά προέρχονται από την ίδια γεωγραφική περιοχή εμφανίζουν ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες (Persando Oddo et al., 2004). Αυτό ενισχύει το γεγονός ότι οι μέλισσες, που έχουν διατροφή πλούσια σε γύρη προελεύσεως από διαφορετικά είδη φυτών έχουν πιο ενισχυμένο ανοσοποιητικό σύστημα σε σχέση με αυτές που τρέφονται κυρίως με ένα είδος γύρης (Alaux et al. 2010). Το ισχυρό ανοσοποιητικό σύστημα συμβάλει στην παραγωγή ένζυμων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αντιμικροβιακή απόκριση των μελισσών (οξειδάση της γλυκόζης). Η μεγάλη έκκριση της οξειδάσης της γλυκόζης στο μέλι, λόγω της διατροφής των μελισσών, μπορεί να είναι και ο λόγος για τον οποίο μέλια με άγνωστη βοτανολογική προέλευση παρουσιάζουν τόσο καλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Τα αποτελέσματα μας συνάδουν με το γεγονός αυτό, καθώς για τα 2 μέλια με την μεγαλύτερη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (τα μέλια 5 και 6) δεν γνωρίζουμε την βοτανολογική πηγή τους και υποθέτουμε ότι η διατροφή των μελισσών που παρήγαγαν αυτά τα 2 μέλια ήταν πολυφυτική και πλούσια σε πολλά είδη γύρης. Μπορούμε να παρατηρήσουμε, ότι τα μέλια 1 και 17 που εμφάνισαν ικανοποιητικά επίπεδα υπεροξειδίου, προέρχονται από πολλαπλά είδη φυτών, όπως παρατηρούμε από τον πίνακα 2.1, υποδεικνύοντας ότι η πολυφυτική διατροφή των μελισσών παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι σκουρόχρωμα μέλια εμφανίζουν συγκρίσιμες αντιμικροβιακές ιδιότητες με το μέλι *Manuka* σε αντίθεση με μέλια με πιο ανοιχτό χρώμα που έχουν μικρότερη αντιμικροβιακή ικανότητα (Bogdanov, 2012). Γνωρίζουμε ότι οι πολυφαινόλες τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή είναι υπεύθυνα για το χρώμα του μελιού και μέλια με μεγαλύτερη συγκέντρωση των ουσιών αυτών, συνήθως εμφανίζουν πιο σκούρο χρώμα. Οι πολυφαινόλες έχουν συσχετιστεί με την σημαντική παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Akagawa et al. 2003; Long et al. 2010). Συνεπώς, συγκεκριμένες πολυφαινόλες φυτικής προέλευσης μπορούν να αποτελέσουν μια επιπρόσθετη πηγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μέλι, με αποτέλεσμα να μπορούμε να συσχετίσουμε τη μεγαλύτερη

αντιμικροβιακή δραστηριότητα κάποιων μελιών με την εμφάνιση πιο σκούρου χρώματος. Τα ελληνικά μέλια από την περιοχή του Ολύμπου, τα οποία εμφάνισαν μεγάλη και μέτρια παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, και πιο συγκεκριμένα τα μέλια 5,6,1 και 11, έχουν αρκετά σκούρο χρώμα σε σχέση με άλλα δείγματα που μελετήσαμε των οποίων το χρώμα ήταν εμφανέστερα πιο ανοιχτό. Η διάλυση του μελιού σε νερό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης η οποία κατά την ωρίμανση απενεργοποιείται λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης των σακχάρων. Τα αποτελέσματα μας συνάδουν με αυτό, καθώς όχι μόνο η αραίωση σε μεγαλύτερη ποσότητα νερού αλλά και η επώαση για αρκετό χρονικό διάστημα στους 37 βαθμούς κελσίου (ιδανική θερμοκρασία για την οξειδάση της γλυκόζης), ώθησε τα μέλια να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα μέλια τα οποία εμφάνισαν και τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου, χρειάζονταν τρεις ώρες επώασης, σε σχέση με τα μέλια που είχαν μικρότερες συγκεντρώσεις και χρειάζονταν λιγότερο χρονικό διάστημα επώασης. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι η συγκέντρωση και η δραστηριότητα της οξειδάσης της γλυκόζης στα μέλια με τη μεγάλη συγκέντρωση υπεροξειδίου, είναι μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες της οξειδάσης των μελιών με μικρή συγκέντρωση υπεροξειδίου, αλλά χωρίς τη μελέτη της κινητικής των ενζύμων του κάθε μελιού, τα παραπάνω δεν μπορούν να είναι τίποτα άλλο πέρα από εικασίες.

Στα δείγματα μας έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της μέθυλ-γλυοξάλης, χωρίς όμως κάποιο από αυτά να δώσει αποτέλεσμα. Κανένα μέλι δεν είχε ποσότητα μέθυλ-γλυοξάλης ικανή να ανιχνευτεί από το διαθέσιμο φασματοφωτόμετρο, είτε γιατί δεν υπάρχει καθόλου ουσία στα μέλια ή γιατί το αναλυτικό όργανο δεν εμφανίζει επίπεδα ευαισθησίας ικανά να ανιχνεύσουν τις πολύ μικρές συγκεντρώσεις της μέθυλ-γλυοξάλης που τυχόν υπάρχουν στα δείγματα μας. Η μέθυλ-γλυοξάλη έχει την ικανότητα να καταστρέφει κάποιες πρωτεΐνες στο μέλι *Manuka* (Majtan et al., 2012), και αυτό αποτελεί το λόγο για τον οποίο το μέλι δεν παράγει ικανοποιητικά επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς μπορεί να υπάρξει συσχετισμός μεταξύ παρουσίας μέθυλ-γλυοξάλης και καταστροφής της οξειδάσης της γλυκόζης. Τα περισσότερα από τα δείγματα μας εμφάνισαν ικανότητα παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου οπότε μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η οξειδάση της γλυκόζης είναι ενεργή, συνεπώς δεν έχει καταστραφεί από τη μέθυλ-γλυοξάλη η οποία, είτε δεν υπάρχει ή είναι σε συγκεντρώσεις μη ικανές να επιφέρουν αλλαγές στη δομή του ενζύμου των δειγμάτων μας.

Τέλος, τα μέλια από την ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου παρουσιάζουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς τη συγκέντρωση του ενδογενούς υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενώ ταυτόχρονα δεν εμφανίζουν ανιχνεύσιμες ποσότητες μέθυλ-γλυοξάλης. Είναι ανάγκη να πραγματοποιηθεί περεταίρω ερευνά των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των ελληνικών μελιών και τους τρόπους δράσης τους στην καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών, ειδικά λόγω της εμφάνισης μικροοργανισμών που παρουσιάζουν εκτενή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

V. Βιβλιογραφία

Abdullah A.A and Clemencia Al., 2009,Effect of Natural Honey (Produced by African sculata in Guyana) Against Bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and Fungus (*Candida albicans*), Word Journal of Dairy & Food Sciences 4 (1): 73-33

Adams CJ, Boulton CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MN, Manley-Harris M, Snow MJ: Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 2008;343:651–659.

Alaux, C., Ducloz, F., Crauser D. and LeConte Y.(2010).Diet effects on honey bee immune competence. *Biol. Lett.* 6, 562–565.

Allen KL, Hutchinson G, Molan PC. The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. First World Healing Congress, Melbourne, Australia 2000; 10-13.

Akagawa M, Shigemitsu T, Suyama K (2003) Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 2632–2640

Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Battino M (2013) Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Curr Med Chem* 20: 621–638

Alvarez-Suarez Sara Tulipani, Romandini S, Bertoli E, Battino M, 2010 Contribution of honey in nutrition and human health: a review, *Mediterr J Nutr Metab* 3:15–23

Al-Waili NS, Salom K, Butler G, et al. Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. *J Med Food* 2011;14:1079-1096.

Al-Waili N, Akmal M, Al-Waili F, et al. The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. *Med Sci Monit* 2005;11:BR433-BR438.

Al-Waili NS, Haq A. Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. *J Med Food* 2004;7:491-494.

Al-Waili NS. Effects of honey on the urinary total nitrite and prostaglandins concentration. *Int Urol Nephrol* 2005;37:107-111.

Al-Waili N, Boni N. Honey increased saliva, plasma, and urine content of total nitrite concentrations in normal individuals. *J Med Food* 2004;7:377-380.

Al-Waili N. Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J Med Food* 2004;7:210-222.

Anthimidou and Mossialos 2012 Antibacterial Activity of Greek and Cypriot Honeys Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Comparison to Manuka Honey *J Med Food* 2013, 16(1): 42-47.

Bang LM, Bantting C, Molan PC (2003) The effects of dilution rate on hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *J Altern Complement Med* 9:267–273

Bednarski, W., Jedrychowski, L., Hammond, E. G., Nikolov Z. L., A method for the determination of alpha-dicarbonyl compounds. *J. Dairy Sci.* 1989, 72, 2474 –2477.

Bilikova K, Simuth J (2010) New criterion for evaluation of honey: quantification of royal jelly protein apalbumin 1 in honey by ELISA. *J Agric Food Chem* 58:8776–8781

Bogdanov S. Honey as nutrient and functional food. *Bee Product Sci* 2012;1-28.

Brudzynski, K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Can. J. Microbiol.* (2006).52, 1228–1237.

Brudzynski K, Abubaker A, St-Martin L, Castle A (2011) Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Front Microbiol* 2:1–9

Brudzynski, K., and Miotto, D. (2011a). The recognition of high molecular weight melanoidins as the main components responsible for radical scavenging capacity of unheated and heat-treated Canadian honeys. *Food Chem.* 125, 570–575

Brudzynski, K., and Miotto, D. (2011b). Honey melanoidins. Analysis of a composition of the high molecular weight melanoidin fractions exhibiting radical scavenging capacity. *Food Chem.* 127, 1023–1030.

Brudzynski K, Abubaker K, Miotto D. Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chem* 2012; 133:329-336.

Bucekova M, Valachova I, Kohutova L, Prochazka E, Kloudiny J, Majtan J Honeybee glucose oxidase its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂ mediated antibacterial activity in natural honeys *Naturwissenschaften* (2014) 101:661–670

Carter, C. and Thornburg, R. W. (2004) Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends Plant Sci* 9, 320–324. 29.

Cernak M, Majtanova N, Cernak A, Majtan J (2012) Honey prophylaxis reduces the risk of endophthalmitis during perioperative period of eye surgery. *Phytother Res* 26:613–616

Chen C, Campbel L, Blair S, et al. The effect of standard heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey. *Front Microbiol* 2012;3

Chen C, Campbell LT, Blair SE, Carter DA (2012) The effect of standard heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey. *Front Microbiol* 3:1–8

Cooper RA, Molan PC, Harding KG. Honey and gram positive cocci of clinical significance in wounds. *J Appl Microbiol* 2002; 93: 857-863.

Cooper RA, Halas E, Molan PC. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burn Care Rehabil* 2002; 23: 366-370.

Cushnie T, Lamb A. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26:343-356.

Davidson, P.M., 1993. Parabens and phenolic compounds. In: Davidson, P.M., Branen, A.L. ŽEds., *Antimicrobials in Foods*. 2nd edn. Marcel Dekker, New York, pp. 263–306.

De Grandi-Hoffman G, Hagler J (2000) The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Soc* 47:302–306

De Revel, G., Bertrand, A., A method for the detection of carbonyl compounds in wine: Glyoxal and methylglyoxal. *J. Sci. Food Agric.* 1993, 61, 267 –272.

Dixon B. Bacteria can't resist honey. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 116.

Dustmann JH: Activity of catalase in honey of Ericaceae-flower. *Z Lebensm Unters Forsch* 1971; 145:294–295.

Ferreres, F., Andrade, P., Gil, M.I., Thomas-Barberian, F.A., 1996. Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 202, 40–44.

Ferguson, G. P., T_temeyer, S., MacLean, M. J., Booth, I. R., Methylglyoxal production in bacteria: Suicide or survival? *Arch. Microbiol.* 1998, 170, 209–218.

Frankel, S., Robinson, G.E., Berenbaum, M.R., 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of fourteen unifloral honeys. *J. Apic. Res.* 37 Ž1., 27–31.

Ghosh, M., Talukdar, D., Ghosh, S., Bhattacharyya, N., et al., In vivo assessment of toxicity and pharmacokinetics of methylglyoxal. Augmentation of the curative effect of methylglyoxal on cancer-bearing mice by ascorbic acid and creatine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006, 212, 45–58.

Gonzalez-Teuber, M., Eilmus, S., Muck, A., Svatos, A., and Heil, M. (2009) Pathogenesis-related proteins protect extrafloral nectar from microbial infestation. *Plant J.* 58, 464–473.

Gil, M.I., Ferreres, F., Ortiz, A., Subra, E., Thomas-Barberian, F.A., 1995. Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2833–2838.

Hayashi, T., Shibamoto, T., Analysis of methylglyoxal in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 1985, 33, 1090 – 1093.

Henle, T., Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids* 2005, 29, 313 –322.

Henle, T., Miyata, T., Advanced glycation end products in uremia. *Adv. Ren. Replace. Ther.* 2003, 10, 321–331.

Hillwig, M. S., Liu, X. T., Liu, G. Y., Thornburg, R. W., and MacIntosh, G. C. (2010) Petunia nectar proteins have ribonuclease activity. *J. Exp. Botany* 61, 2951–2965.

Hillwig, M. S., Kanobe, C., Thornburg, R. W., and MacIntosh, G. C. (2011) Identification of S-RNase and peroxidase in petunia nectar. *J. Plant Physiol.* 168, 734–738.

Kalapos, M. P., Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 1999, 110, 145–175.

Kingsley A. The use of honey in the treatment of infected wound. *British J Nursing* 2001; 10: S13-S16.

Klaudiny J, Bachanova K, Kohutova L, Dzurova M, Kopernicky J, Majtan J (2012) Expression of larval jelly antimicrobial peptide defensin1 in *Apis mellifera* colonies. *Biologia* 67: 200–211

Kuncic MK, Jaklic D, Lapanje A, et al. Antibacterial and antimycotic activities of Slovenian honeys. *Br J Biomed Scxi* 2012;69: 154-158.

Kwakman, P. and Zaat, S., 2012, Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life* 64 (1), 48-55.

Kwakman PH, te Velde AA, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls CM, Zaat SA: Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. PLOS One 2011;6: 17709.

Kwakman PH, te Velde AA, de Boer L, Speijer D, Vandenbroucke- Grauls CM, Zaat SA: How honey kills bacteria. FASEB J 2010;24:2576–2582

Kwakman H, Van den Akker P, et al. Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. Clin Infect Dis 2008;46:1677-1682.

Lankin VZ, Konovalova GG, Tikhaze AK, Nedosugova LV: The effect of natural dicarbonyls on activity of antioxidant enzymes in vitro and in vivo. Biochemistry (Mosc) 2012;6:81–86.

Li J, Feng M, Zhang Z, Pan Y (2008) Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera*). Apidologie 39:199–214

Liu F, Li W, Li Z, Zhang S, Chen S, Su S (2011) High-abundance mRNAs in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. J Insect Physiol 57:274–279

Long LH, Hoi A, Halliwell B (2010) Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. Arch Biochem Biophys 501:162–169

Lusby PE, Coombes A, Wilkinson JM. Honey: A potent agent for wound healing? J Wound Ostomy Continence Nurs 2002; 29: 295-300.

Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. Arch Med Res 2005; 36: 464-467.

Majtan J et al (2012) Methylglyoxal-induced modifications of significant honeybee proteinous components in manuka honey: possible therapeutic implications. Fitoterapia 83:671–677

Majtan J, Bohova J, Prochazka E, Klaudiny J (2014) Methylglyoxal may affect hydrogen peroxide accumulation in manuka honey through the inhibition of glucose oxidase. J Med Food 17:290–293

Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand Mol. Nutr. Food Res. 2008, 52, 483 – 489

Mavric, E., Kumpf, Y., Schuster, K., Kappenstein, O. et al., A new imidazolinone resulting from the reaction of peptide-bound arginine and oligosaccharides with 1,4- glycosidic linkages. Eur. Food Res. 2004, 218, 213 –218.

Marcucci, M.C., 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26, 89–99.

Molan P. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 2006;73:5-28.

Molan PC. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Int J Low Extrem Wounds* 2006; 5: 40-54.

Molan PC. The antibacterial nature of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992; 73: 5-28.

Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L., Turk, Z., Methylglyoxal in food and living organism. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 1105–1117.

Ohashi K, Natori S, Kubo T (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur J Biochem* 265:127–133

Pernal,S.F.,andCurrie,R.W.(2000). Pollen quality of fresh and 1-year- old single pollen diets for worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 31, 387–409.

Persando Oddo L, Pipro R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* 2004;35:S38-S81.

Robert B, 2014, Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria, *Trends in Microbiology* September, 22 (9)

Rutala,W.A., Weber,J.D., and The Health care Infection Control Practices Advisory Committee.(2008). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Health care Facilities, 2008*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Department of Health and Human Services USA, Chapel Hill,NC.

Santos KS, Delazari Dos Santos L, Anita Mendes M, Monson De Souza B, Malaspina O, Palma MS (2005) Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochem Mol Biol* 35: 85–91

Seeley TD (1992) The tremble dance of the honey bee: message and meanings. *Behav Ecol Sociobiol* 47:311–316

Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S. and Humphreys, H., 2010, Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Complementary and Alternative Medicine* 10 (47) : 1-5

Simon A, Traynor K, Santos K, Blaser G, Bode U, Molan P. Medical honey for wound care - still the 'Latest Resort'. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; doi:10.1093/ecam/nem175.

Snowdon, J.A., Cliver, D.O., 1996. Microorganisms in honey. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 1–26.

Tan H, Rahman A, Gan S, Halim A, Hassan S, Sulaiman S and Kirnpalk BS, 2009, The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9:34 doi:10.1186/1472-6882-9-3

Taormina P, Niemira B, Beuchat L. Inhibitory activity of honey against food- borne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int J Food Microbiol* 2001;69:217-225.

Van den Berg AJ, Van den Worm E, Van Ufford HC, Halkes SB, Hoekstra MJ, Beukelman CJ. An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. *J Wound Care* 2008; 17: 172-178.

Visavadia BG, Honeysett J, Danford MH. Manuka honey dressing: An effective treatment for hronic wound infections. *Br J Maxillofac Surg* 2006; 44: 38-41.

Vlcekova P, Krutakova B, Takac P, Kozanek M, Salus J, Majtan J (2012) Alternative treatment of gluteofemoral fistulas using honey: a case report. *Int Wound J* 9:100–103

Weston,R.J.(2000).The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey:a review. *FoodChem.* 71, 235–239.

Winston ML (1987) The biology of honey bees. Harvard University Press, Cambridge

White, J.W.Jr., 1993,Honey, in the hive and the honey bee. Dadant and Sons Publication Hamilton-Illinois : 869-895

White J.H., SubersM.H. and Schepartz A.I.(1963).The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its originina honey glucose-oxidase system. *Biochem.Biophys.Acta* 73, 57–70.

Zumla A, Lulat A: Honey—a remedy rediscovered. *J R Soc Med* 1989;82:384–385.

Ηλεκτρονικές πηγές

Φορέας Εθνικού Δρυμού Ολύμπου, 2008

http://www.olympusfd.gr/gr/Xlorida_Panida.asp