



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**«In vitro μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας
γηγενών ποικιλιών του μελιού»**

**«In vitro study of the antioxidant capacity of
indigenous varieties of honey»**

Λαγγούρα Ειρήνη του Ιωάννη

Λάρισα, 2022

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων), Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βεσκούκης Αριστείδης, Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Φυσικής Αγωγής, Αθλητισμού και Διαιτολογίας, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας

Παπουτσοπούλου Σταματία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πίνακας περιεχομένων

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή	2
Πίνακας περιεχομένων.....	3
Υπόμνημα εικόνων	5
Υπόμνημα διαγραμμάτων	5
Υπόμνημα πινάκων.....	5
Περίληψη	6
Abstract.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΜΕΛΙ.....	8
1.2 ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΑ.....	9
1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	9
1.4 ΤΥΠΟΙ ΜΕΛΙΟΥ	10
1.5 ΣΥΣΤΑΣΗ ΜΕΛΙΟΥ	12
1.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΛΙΟΥ	12
1.7 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΛΙΟΥ.....	14
1.8 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΛΙΟΥ	16
1.11 ΑΝΤΙΟΞΕΙΩΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΛΙΟΥ.....	22
1.12 ΜΕΛΙ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ.....	23
2. Σκοπός.....	25
3. Υλικά και μέθοδοι.....	26
3.1. Συλλογή δειγμάτων	26
3.2 Επεξεργασία δειγμάτων	26
3.3 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu	26
3.4 Μέθοδος DPPH•.....	27
3.5 Μέθοδος ABTS•+	28
3.6 Superoxide Radical	30
3.7 Hydroxyl Radical	30
3.8 Reducing power assay	31
3.9 Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA	32
3.10 Στατιστική Ανάλυση	34

4. Αποτελέσματα	34
4.1 Μέθοδος DPPH.....	34
4.2 Μέθοδος ABTS	35
4.3 Μέθοδος Hydroxyl Radical.....	36
4.4 Μέθοδος Superoxide Radical.....	36
4.5 Η επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA	37
4.6 Μέθοδος Reducing Power.....	38
Συζήτηση.....	40
Βιβλιογραφία	45

Υπόμνημα εικόνων

Εικόνα 1 Μελισσοκόμος με καπνιστήρι και ειδικό προστατευτικό ρουχισμό. ...**Error! Bookmark not defined.**

Εικόνα 2 Η παγκόσμια παραγωγή μελιού ανά χώρα (1000 T) (Επιτροπή, 2022)
..... **Error! Bookmark not defined.**

Εικόνα 3 Σχηματική αναπαράσταση της ταξινόμησης των αντιοξειδωτικών (Misra et al., 2014). **Error! Bookmark not defined.**

Εικόνα 4 Αντιοξειδωτικά ως όπλα καταπολέμησης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου.
..... **Error! Bookmark not defined.**

Εικόνα 5 Δεξιά: Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζυλ (DPPH-).
Αριστερά: Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνης.....28

Εικόνα 6 Παραγωγή της ρίζας του ABTS•- μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H₂O₂.29

Εικόνα 7 Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του ABTS•+.....29

Εικόνα 8 Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA.....33

Εικόνα 9 Πηκτή αγαρόζης.33

Υπόμνημα διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα μεθόδου DPPH. Τα αποτελέσματα έχουν εκφρασθεί σε IC₅₀±SEM.....35

Διάγραμμα 2 Οι τιμές IC₅₀ μέσω της μεθόδου ABTS. .. **Error! Bookmark not defined.**

Διάγραμμα 3: Οι τιμές IC₅₀ μέσω της μεθόδου Hydroxyl Radical.36

Διάγραμμα 4: Οι τιμές IC₅₀ μέσω της μεθόδου Superoxide radical.....37

Διάγραμμα 5: Οι τιμές IC₅₀ μέσω της μεθόδου Plasmid relaxation.38

Διάγραμμα 6: Οι τιμές AU_{0,5}.39

Υπόμνημα πινάκων

Πίνακας 1 Δείγματα μελιών (τύπος και ημερομηνία συγκομιδής).....26

Πίνακας 2 Αποτελέσματα μετρήσεων Folin-Ciocalteu.....29

Περίληψη

Η μελισσοκομία είναι μια τεχνική για την οποία υπάρχουν αναφορές από αρχαίους, προηγμένους, για την εποχή πολιτισμούς. Σήμερα, η Ε.Ε. ταξινομείται στη δεύτερη θέση παραγωγής μελιού μετά την Κίνα. Στην Ελλάδα οι παραγωγοί μελιού είναι αρκετοί παράγοντας όμως μικρότερες ποσότητες, καθιστώντας την Ελλάδα στις πρώτες 5 χώρες παραγωγούς της Ε.Ε.. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια τάση προς έναν διαφορετικό τρόπο ζωής. Πιο συγκεκριμένα, οι άνθρωποι αθλούνται και προσέχουν περισσότερο την διατροφή τους με απώτερο σκοπό το ευ ζην αλλά και την αύξηση του προσδόκιμου ζωής τους. Μελέτες έχουν αναδείξει την διατροφική αξία του μελιού καθώς έχει αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάστηκαν 10 διαφορετικά ως προς τον ανθικό τους τίτλο είδη μελιού ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Πιο συγκεκριμένα εκτιμήθηκε το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων, η ικανότητά τους να αναστείλουν τις ρίζες DPPH, ABTS, ρίζα υδροξυλίου και ρίζα σουπεροξειδίου, την αναγωγική τους ικανότητα καθώς και την ικανότητα τους να προστατεύσουν το πλασμιδιακό DNA από βλάβες προκαλούμενες από ρίζες περοξυλίου.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα μέλια Βελανιδιάς είναι εκείνα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στις περισσότερες μεθόδους που ελέγχθηκαν. Υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα σε ορισμένες μεθόδους παρουσίασε και το μέλι Δάσους παρά την χαμηλή, συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα, περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες.

Μελλοντικά, προτείνεται η μελέτη των μελιών σε περισσότερες περιοχές με διαφορετική βιοποικιλότητα, κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες, ώστε να διευρυνθούν οι γνώσεις μας σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των μελιών και να προκύψουν τελικά προϊόντα με μεγαλύτερη προστιθέμενη αξία.

Abstract

Beekeeping is a technique for which there are references from ancient civilizations that were advanced for the time. Today, the E.U. ranks second in honey production after China. There are many honey producers in Greece, but they produce small quantities. In recent years there has been a trend towards a different lifestyle. More specifically, people exercise more and pay more attention to their diet with the ultimate goal of well-being and increasing their life expectancy. Studies have highlighted the nutritional value of honey as it has antibacterial, antioxidant and antimicrobial properties.

In this thesis, 10 different types of honey were examined in terms of their antioxidant capacity. More specifically, the total polyphenolic content of the samples, their ability to inhibit DPPH, ABTS, Hydroxyl Radical and Superoxide Radical radicals, their reducing capacity as well as their ability to protect plasmid DNA from damage caused by peroxy radicals were evaluated.

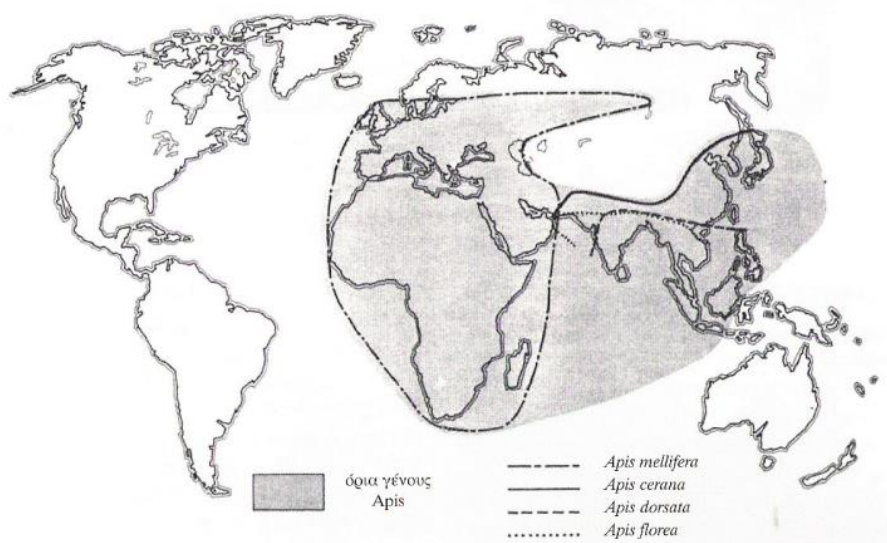
The results of the study showed that the oak honeys are the ones with the highest antioxidant capacity in most of the tested methods. Even though the forest honey has lower polyphenolic content compared to the other samples, it showed high antioxidant activity in some methods. Hence, honeys from different places with different biodiversity, climatic and soil conditions is proposed, in order to enhance our knowledge, regarding the antioxidant capacity of them and produce higher value-added products.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΕΛΙ

Το μέλι χαρακτηρίζεται ως μια γλυκιά φυσική ουσία που παράγεται από τις μέλισσες του είδους *Apis mellifera*. Προκειμένου να παράξουν το μέλι, οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ από τα άνθη των φυτών το οποίο εν συνεχεία μεταβάλλεται από τις ίδιες τις μέλισσες ώσπου να έχει την επιθυμητή σύσταση (Olaitan et al., 2007).

Οι ιστορικοί αναλυτές αναφέρουν ότι το μέλι αλλά και οι μελισσοκομικές γνώσεις προέρχονται από την αρχαία Αίγυπτο. Στην Ελλάδα εντοπίστηκαν κυψέλες που χρονολογούνται από το 3.400 π.Χ. στη Φαιστό. Η συστηματική μελισσοκομία ασκείται από τον 15^ο αιώνα, όπως και οι εξαγωγές μελιού στην Κωνσταντινούπολη (Πίττας, 2017).



Εικόνα 1: Διασπορά των αρχαιότερων ειδών του γένους *Apis* (Morse and Hooper, 1985)

Το μέλι στην Ελλάδα είναι ένα προϊόν ιδιαίτερα σημοφιλές και όλο και περισσότεροι άνθρωποι ασχολούνται με τον πρωτογενή τομέα και τον κλάδο της μελισσοκομίας. Όσον αφορά τα είδη των μελισσών, υπάρχουν 4 φυλές, σύμφωνα με τη συστηματική κατάταξη του Ruttner, οι *A. mellifera macedonica*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera cecropia* και *A. mellifera adami*. (Suarez, Lighton, Joos 1996) Σήμερα κυριαρχεί η μακεδονική φυλή σχεδόν σε ολόκληρο τον κόσμο εξαιτίας της ανθεκτικότητας της φυλής στην τραχειακή ακαρίαση καθώς επίσης είναι λιγότερο

επιθετική συγκριτικά με τις υπόλοιπες φυλές. Οι φυλές αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια στη χώρα μας, μέσω της μελέτης των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών, τους ενζυμικούς πολυμορφισμούς και τους πολυμορφισμούς του μιτοχονδριακού γενετικού υλικού (Bouga et. al., 2005).

1.2 ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΑ

Στην Ελλάδα υπάρχουν αναφορές για τη μελισσοκομία ήδη από τα προϊστορικά χρόνια σύμφωνα με γραπτά του Αριστοτέλη. Σήμερα εφαρμόζεται είτε ο παραδοσιακός τρόπος μελισσοκομίας, όπου το σύνολο των κυψελών βρίσκονται σε ένα μέρος, και ο νομαδικός τρόπος μελισσοκομίας, όπου οι κυψέλες μεταφέρονται όπου υπάρχουν άνθη. Ο δεύτερος τρόπος είναι πιο αποτελεσματικός και αποδοτικός. Η Ελλάδα διαθέτει ιδανικές κλιματολογικές συνθήκες για μελισσοκομία, ωστόσο η παραγωγή ελληνικού μελιού δεν φτάνει για να καλύψει τις εγχώριες κατανάλησης. Στη χώρα μας κυριαρχεί το μέλι πεύκου σε ποσοστό 55-60% και ακολουθούν το μέλι θυμαριού σε ποσοστό 15% και ελάτης που κυμαίνεται από 5-10% (Harissis & Harissis, 2009).

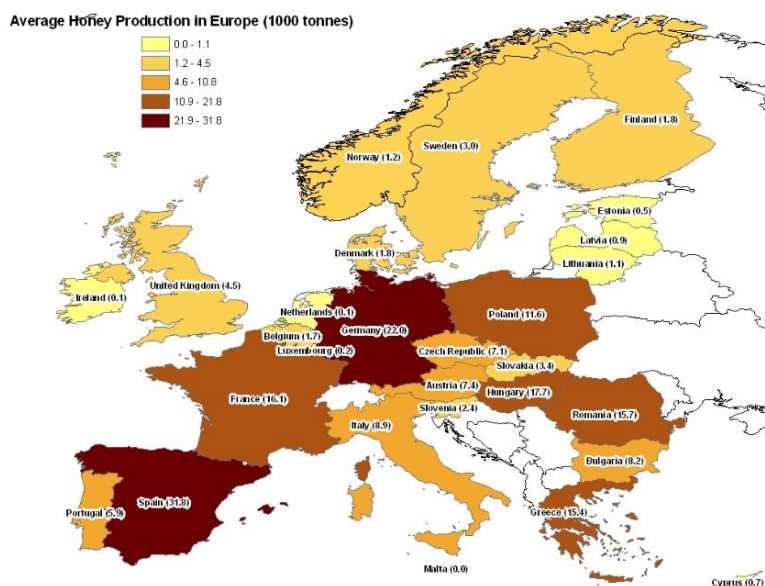


Εικόνα 2: Μελισσοκόμος με τον κατάλληλο εξοπλισμό

1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Στην Ε.Ε. σύμφωνα με τα δεδομένα τις τελευταίας δεκαετίας υπάρχουν 15 εκατομμύρια κυψέλες, ενώ η παραγωγή του μελιού ανέρχεται σε 218.000 τόνους. Οι άνθρωποι με την εν λόγω ενασχόληση ανέρχονται περίπου στους 600.000 (Hendrikx et. al., 2010).

Οι νότιες χώρες της Ευρώπης όπως η Ελλάδα, η Ιταλία και η Ισπανία έχουν τη μεγαλύτερη παραγωγή μελιού λόγω των ευνοϊκών καιρικών συνθηκών. Η Ε.Ε. ταξινομείται στην δεύτερη θέση παραγωγής μελιού μετά την Κίνα, καθώς παράγει τη διπλάσια ποσότητα συγκριτικά με την Ευρώπη. Στην Τρίτη θέση βρίσκεται η Τουρκία, η οποία παράγει περίπου 100.000 τόνους μέλι ετησίως. Οι ανάγκες στην Ε.Ε είναι αρκετά μεγαλύτερες ώστε να καλυφθούν από την δική της παραγωγή, επομένως γίνεται εισαγωγή από την Κίνα αλλά και από χώρες όπως Μεξικό και Αργεντινή. Οι ανάγκες της Ευρώπης σε ετήσια παραγωγή είναι σχεδόν διπλάσιες από τις επιθυμητές οπότε πραγματοποιείται εισαγωγή από την Κίνα, η οποία ανέρχεται στο 40% (Meo et. al., 2017). Χώρες όπως η Ισπανία, η Πολωνία, η Ελλάδα, η Ολλανδία, η Ιταλία, η Πορτογαλία, η Τσεχία και η Κροατία παράγουν το 47% της συνολικής ποσότητας μελιού (Global Trade, 2020).



Εικόνα 3: Απεικόνιση της μέση παραγωγής μελιού με βάση τα δεδομένα των FAOSTAT και EUROSTAT (EFSA, 2008).

1.4 ΤΥΠΟΙ ΜΕΛΙΟΥ

Το είδος του μελιού εξαρτάται αποκλειστικά από την διατροφή της μέλισσας και διαχωρίζεται σε μέλι νέκταρ και μέλι νέκταρ με μελίτωμα, ενώ γίνεται επιμέρους κατηγοριοποίηση σε μονοανθικό και πολυανθικό έπειτα από γυρεοσκοπική ανάλυση. Τα μελιτώματα είναι εκκρίσεις φυτών και εντόμων από τις οποίες τρέφονται πολλές φορές οι μέλισσες. Σήμερα είναι γνωστές περίπου 320 διαφορετικές ποικιλίες μελιού.

Μερικά από τα πιο γνωστά είναι το θυμαρίσιο μέλι, το μέλι πεύκου κ.ά. Το ολοκληρωμένο προφίλ των γυρεόκοκκων και της βοτανικής προέλευσης προσδιορίζεται μέσω της γυρεοσκοπικής ανάλυσης (Van der Ohe et al., 2004). Για να χαρακτηριστεί ως μονοανθικό θα πρέπει να εντοπίζεται ένα είδος φυτού συνήθως σε ποσοστό πάνω του 30% αλλιώς χαρακτηρίζεται ως πολυανθικό (πχ ανθόμελο) (Minerva 2012). Η χημική σύσταση και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά είναι βασικοί παράγοντες για τον καθορισμό της ποιότητας του μελιού. (Meo et. al., 2017).

1.5. ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΚΥΨΕΛΗΣ

Εκτός από το μέλι υπάρχουν και άλλα προϊόντα που παράγονται στην κυψέλη όπως η πρόπολη, ο βασιλικός πολτός, η γύρη, το κερί και το δηλητήριο της μέλισσας.

Η πρόπολη είναι μια ρητινώδης ουσία που συλλέγεται από τις μέλισσες και αναμιγνύεται με γύρη, ένζυμα και κερί και χρησιμοποιείται για να σφραγιστούν χαραμάδες της κυψέλης αλλά και να απολυμανθούν τα τοιχώματα των κελιών ώστε να διασφαλιστεί ένα υγιές περιβάλλον για τη βασίλισσα και τα αυγά της. Η πρόπολη είναι γνωστή για την ικανότητά της να βοηθά στην επούλωση επιφανειακών τραυμάτων αλλά και για τις αντικές και αντιμικροβιακές της ιδιότητες (Viuda-Martos et al., 2008).

Η γύρη παράγεται στους ανθήρες των ανθέων και είναι ζωτικής σημασίας για την κυψέλη αφού αποτελεί τροφή των νεαρών μελισσών. Είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και βιταμίνες (A, B, E και C). Καταναλώνεται και από τον άνθρωπο, ωστόσο σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να είναι τοξική.



Εικόνα 4: Μέλισσα που συλλέγει γύρη

Ο βασιλικός πολτός εκκρίνεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες των εργατριών μελισσών και είναι η βασική τροφή των προνυμφών και της βασίλισσας (Pavel et al.,

2011).

Το κερί παράγεται από τους κηρογόνους αδένες που εντοπίζεται στην κοιλιακή επιφάνεια της κοιλιάς των θηλυκών μελισσών. Από εκεί εκκρίνεται ένα διαυγές υγρό το οποίο στερεοποιείται με τη μορφή “λεπιών” στην εξωτερική επιφάνεια της κοιλιάς (Ahmad et al., 2020).



Εικόνα 5: Κερί μέλισσας

1.5 ΣΥΣΤΑΣΗ ΜΕΛΙΟΥ

Η σύνθεση του μελιού καθορίζεται σχεδόν αποκλειστικά από τα είδη των φυτών που επισκέπτονται οι μέλισσες και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης (Brand, 2015) Οι υδατάνθρακες είναι τα κύρια συστατικά του μελιού. Οι μονοσακχαρίτες όπως η φρουκτόζη και η γλυκόζη αποτελούν το κυρίαρχο κλάσμα και αποτελούν το 65-80% των σακχάρων του μελιού (Bertoncelj et al., 2007; Guler et al., 2007; Sanz et al., 2004).

Το μέλι περιέχει και άλλα συστατικά όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, αμινοξέα και οργανικά οξέα, βιταμίνες, πτητικές ενώσεις, φαινολικά οξέα (καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, σιδηρολικό οξύ, ελλαγικό οξύ, χλωρογενικό οξύ), φλαβονοειδή (χρυσίνη, πινοκαμβρίνη, πινομπανκσίνη, κερκετίνη, λουτεολίνη, απιγενίνη κ.λπ.) και καροτενοειδή. Το κάλιο είναι το κύριο ανόργανο στοιχείο του μελιού ενώ άλλα ανόργανα στοιχεία είναι ο φώσφορος, το ασβέστιο, το νάτριο, το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος και το μαγγάνιο (Belouali et al., 2008).

1.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΛΙΟΥ

Η διαδικασία παρασκευής του μελιού είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Κυρίαρχο ρόλο σε αυτή παίζουν οι εργάτριες μέλισσες που αποτελούν την πλειοψηφία του πληθυσμού που βρίσκονται στις κυψέλες. Ο ρόλος τους είναι συνεργικός καθώς καμία εργάτρια

δεν μπορεί να παράγει μόνη της χωρίς τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας. Ένα μέρος του συνόλου βγαίνει από την κυψέλη με σκοπό την αναζήτηση νέκταρ. Αφού γίνει η απομύζηση, ακολουθεί η αποθήκευση σε ένα ειδικό στομάχι, σχεδιασμένο γι' αυτό το σκοπό, και η επιστροφή πίσω στην κυψέλη (Pettersson 2015). Μέσω του φάρυγγα και του οισοφάγου, το νέκταρ καταλήγει στον πρόλοβο ή μελιστόμαχο, η χωρητικότητα του οποίου είναι συνήθως 20-40 mg, με μέγιστο τα 70 mg. Εκεί αποθηκεύεται και μεταφέρεται στην κυψέλη (Dade, 1962). Μέσα στον πρόλοβο αρχίζει η διαδικασία της μετατροπής του νέκταρος σε μέλι με την προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες της μέλισσας. Το νέκταρ ξεκινά με περιεκτικότητα 70-80% σε νερό. Αφού επιστρέψουν στη κυψέλη, μια δεύτερη ομάδα εργατριών το λαμβάνει με παλινδρόμηση (από στόμα σε στόμα) με σκοπό την περαιτέρω επεξεργασία του, έπειτα από μάζηση (Suarez et al., 1996) με τη βοήθεια ενζύμων. Η ινβερτάση είναι το σημαντικότερο ένζυμο αφού διασπά την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη και έχει προέλευση αποκλειστικά από τη μέλισσα. Η δράση αυτής συνεχίζεται και μετά τον τρύγο του μελιού. Στο μέλι υπάρχουν και άλλα ένζυμα, με πιο σημαντικά αυτά της διαστάσης και οξειδάσης της γλυκόζης. Ολόκληρη αυτή η διαδικασία διαρκεί περίπου 30 λεπτά. (Rossano et. al., 2012). Στη συνέχεια, οι εργάτριες μεταφέρουν και διαχέουν το μείγμα στις κηρήθρες. Σκοπός είναι η εξάτμιση του νερού που πραγματοποιείται μέσω κινήσεων των φτερών ώστε να εξατμιστεί μέχρι τα επιθυμητά επίπεδα (16-17%). Η παραπάνω διεργασία παραγωγής του μελιού πραγματοποιείται από τις μέλισσες για δικής τους χρήση και επιβίωση. Όταν η γύρη δεν είναι διαθέσιμη κυρίως κατά τους χειμερινούς μήνες, οι μέλισσες τρέφονται με προϊόντα που οι ίδιες έχουν παράξει. Η ποσότητα τροφής που είναι αναγκαία για την επιβίωση της αποικίας τους χειμερινούς μήνες εξαρτάται αρχικά από το μέγεθος της αποικίας και φυσικά από τις τοπικές καιρικές συνθήκες (διάρκεια και ένταση χειμώνα) (Olaitan et al., 2007).



Εικόνα 4: Μεταφορά του νέκταρ από τις εργάτριες μέλισσες πίσω στις κυψέλες και παραλαβή από μια νέα ομάδα εργατριών για περαιτέρω επεξεργασία (Clement, 2007).

1.7 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΛΙΟΥ

Οι παραγόντες που επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μελιού είναι η τοποθεσία της κερήθρας, οι κλιματολογικές συνθήκες, οι μελισσοκομικοί χειρισμοί, καθώς και οι πρακτικές συσκευασίας και αποθήκευσής του.

Ιξώδες και ρευστότητα μελιού: Το ιξώδες του μελιού είναι ένα από τα σημαντικότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του. Αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την επεξεργασία του προϊόντος, τη διαχείριση και την αποθήκευση του, ενώ επηρεάζει την προτίμηση του καταναλωτή γι' αυτό απασχολεί ιδιαίτερα τους μελισσοκόμους. Καθορίζεται από τη ρευστότητα των σωματιδίων, και έχουν αντίστροφη σχέση, δηλαδή όσο αυξάνεται η ρευστότητα τόσο μειώνεται το ιξώδες. Επηρεάζεται από μια πληθώρα παραγόντων, όπως: η σύσταση, η βοτανική προέλευση, η θερμοκρασία, η ποσότητα, το μέγεθος και η κατάσταση των κρυστάλλων, τα είδη και η ποσότητα των κολλοειδών. Το ποσοστό της υγρασίας αποτελεί το σημαντικότερο χαρακτηριστικό που καθορίζει το ιξώδες (Oroian, 2013).

Κρυστάλλωση: Το όνομά της προέρχεται από κρυστάλλους που δημιουργούνται κατά τη συμπύκνωση των μορίων γλυκόζης. Εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως τα ποσοστά των σακχάρων (π.χ.σακχαρόζη, μαλτόζη), των αδιάλυτων ουσιών (π.χ.δεξτρίνη, κολλοειδή, γύρη) καθώς επίσης την αποθήκευση αυτού αλλά και τη θερμοκρασία (Buba et al. ,2013, EL-Metwally, 2015). Καθώς το μέλι είναι ένα υπέρκορο διάλυμα ζάχαρης, οι πρώτοι κρύσταλλοι που δημιουργούνται, καταβυθίζονται και αποτελούν πόλο έλξης για άλλους με αποτέλεσμα να δημιουργούνται συσσωματώματα. Η διαδικασία και η ποσότητα κρυστάλλωσης

διαφέρει ανάλογα με το είδος του μελιού, καθώς η κρυστάλλωση μπορεί να είναι ομοιόμορφη ή και όχι και αυτό εξαρτάται από το μέγεθος των κρυστάλλων που σχηματίζονται (Hamdan, 2015).

Γεύση: Η γεύση του μελιού εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων όπως συμβαίνει σε όλα τα τρόφιμα. Συστατικά που επηρεάζουν περισσότερο τη γεύση του είναι τα οργανικά οξέα καθώς καθορίζουν την οξύτητά του, με πιο σημαντικό από αυτά να είναι το γλυκονικό οξύ. Ιδιαίτερα σημαντική συμβολή στη γεύση έχουν οι υδατάνθρακες καθώς επίσης και τα σάκχαρα. Κύρια σάκχαρα του μελιού είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, ενώ σε υψηλό ποσοστό βρίσκονται ακόμη και η σουκρόζη με τη μαλτόζη. Τέλος το άρωμα, που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα φυτά που συμμετέχουν στη διαδικασία επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη γεύση του μελιού (Wang & Li, 2011).

Άρωμα: Το άρωμα επηρεάζεται τόσο από τα φυτά που συμμετέχουν στη διαδικασία παρασκευής του, όσο και στους χειρισμούς μετά την παρασκευή και την αποθήκευσή του. Η σύσταση των πτητικών οξέων φαίνεται να μεταβάλλεται έπειτα από μακρά περίοδο αποθήκευσης (Wang & Li, 2011).

Χρώμα: Το χρώμα του μελιού κυμαίνεται συνήθως από ανοιχτό κίτρινο έως κεχριμπαρένιο, σκούρο κεχριμπαρένιο και μαύρο σε ακραίες περιπτώσεις και μερικές φορές διαθέτει ακόμη και πράσινη ή κόκκινη απόχρωση. (Bogdanov et al., 2008). Αυτό εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το είδος του φυτού αλλά και το σημείο από το οποίο τράφηκαν οι εργάτριες. Παράγοντες επίσης όπως το ποσοστό της υγρασίας, οι συνθήκες αποθήκευσης, η συσκευασία, η κρυστάλλωση, η θέρμανση και άλλοι χειρισμοί επεξεργασίας μπορούν να συμβάλλουν στην ποικιλομορφία του χρώματος (Bogdanov et al., 2008).

Ζύμωση: Η ζύμωση του μελιού οφείλεται σε ωσμώφιλους ζυμομύκητες, οι οποίοι αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα, ενώ όταν βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες βλαστάνουν και πολλαπλασιάζονται προκαλώντας αλλοίωση στο τελικό προϊόν. Τα χαρακτηριστικά της αλλοίωσης είναι η ξινή γεύση, η παρουσία φυσαλίδων στην επιφάνεια και η διόγκωση, που πολλές φορές μπορεί να είναι τόσο έντονη που να εκτιναχθεί το καπάκι του δοχείου. Η διαδικασία της ζύμωσης επηρεάζεται από παράγοντες όπως η περιεκτικότητα σε υγρασία, η επεξεργασία και η θερμοκρασία συντήρησης. Ένα μέλι με ποσοστό υγρασίας κάτω από 17%, δεν υφίσταται υψηλό

κίνδυνο ζύμωσης. Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη ζύμωση του μελιού είναι μεταξύ 11°C και 21°C. Η υψηλή θερμοκρασία δεν ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μυκήτων, οπότε η πλειοψηφία καταστρέφεται όταν το προϊόν θερμανθεί στους 60 °C για 5-10 λεπτά, ενώ οι σπόροι των μυκήτων στους 72 °C για 10 λεπτά (Subramanian et al., 2007).

Πυκνότητα μελιού: Η πυκνότητα είναι χαρακτηριστικό φυσικό μέγεθος των ρευστών υλικών και ορίζεται ως το ποίλιό της μάζας του υλικού προς τον όγκο αυτού. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα για το στάδιο της τυποποίησης και της επεξεργασίας. Μεγάλη σημασία διαπιστώνεται στην περίπτωση μελιών διαφορετικής πυκνότητας που δεν αναμιγνύονται εύκολα και διαχωρίζονται ανάλογα σε διάφορα στρώματα στη μάζα του προϊόντος. Η δημιουργία στρωμάτων ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών και κατ' επέκταση επηρεάζει την ποιότητα του μελιού. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος του περιέκτη που θα πρέπει να σφραγίζεται ερμητικά κλειστά ώστε η πυκνότητά του να διατηρείται σταθερή (Tchoumboue et al., 2007).

1.8 ANTIMIKROBIAKES IDIOTHTEΣ ΜΕΛΙΟΥ

Οι κύριοι παράγοντες για την αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι η ενζυμική αντίδραση οξείδωσης της γλυκόζης και ορισμένων άλλων συστατικών του (Beretta et al., 2007). Άλλοι παράγοντες που μπορούν να παρουσιάσουν αντιμικροβιακή δράση είναι η υψηλή ωσμωτική πίεση/χαμηλή WA, το χαμηλό pH/οξύ περιβάλλον, η χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, η υψηλή αναλογία άνθρακα προς άζωτο, το χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής λόγω του υψηλού επιπέδου αναγωγικών σακχάρων, το ιζώδες που περιορίζει το διαλυμένο οξυγόνο και άλλους χημικούς παράγοντες/φυτοχημικά. Λόγω των ιδιοτήτων του μελιού, όπως η χαμηλή οξύτητα WA και νερού, η οξειδάση της γλυκόζης και του περοξειδίου του υδρογόνου, το μέλι δεν βοηθά στην ανάπτυξη ζυμομυκήτων και βακτηρίων (Kwakman et al., 2012).

Τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και η λυσοζύμη δρουν συνεργατικά και υποστηρίζουν την αντιμικροβιακή δράση του μελιού (Patton et al., 2006) Επιπλέον, η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα μπορεί να βοηθήσει στην εξάλειψη των βακτηρίων μέσω της όσμωσης (Snowdon et al., 1996). Η ύπαρξη μεθυλογλυοξάλης

(MGO) και η πρόδρομη διυδροξυακετόνη (DHA) έχουν αναγνωρισθεί ως αναστολείς της βακτηριακής ανάπτυξης μέσω της αναστολής της ουρεάσης. Το χαμηλό pH σε συνδυασμό με την υψηλή ωσμωτικότητα έχει διαπιστωθεί ότι ασκούν αντιμικροβιακή δράση (Masoura et al., 2020).

1.9 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Ως αντιοξειδωτική χαρακτηρίζεται μια ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμά της, και ικανή να καθυστερήσει, να μειώσει, ή να παρεμποδίσει την οξείδωση του. Η οξείδωση, δηλαδή η απώλεια ηλεκτρονίων ενός μορίου ή μίας ένωσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελεύθερων ριζών. Τα αντιοξειδωτικά είναι ισχυροί δότες ηλεκτρονίων με την ικανότητα αδρανοποίησης τόσο εξωγενών όσο και ενδογενών ελεύθερων ριζών. Οι παράγοντες που μπορούν να καθορίσουν την ενεργότητα και τη δράση ενός αντιοξειδωτικού μορίου σε ένα σύστημα είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση, το είδος του υποστρώματος, καθώς και η παρουσία άλλων ενώσεων (Siddeeg et al., 2021) Προκειμένου να αποφευχθούν ή να αποκατασταθούν οι επιβλαβείς επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών, τα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών έχουν αναπτύξει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προστασίας. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να περιλαμβάνουν τόσο ενδογενή όσο και εξωγενή μόρια (Li et al., 2016).

Τα αντιοξειδωτικά μόρια διακρίνονται σε αντιοξειδωτικά ένζυμα, καθώς και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια περιλαμβάνονται η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)(Sharma et al., 2018). Οι κύριες κατηγορίες μη ενζυμικών ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση είναι οι βιταμίνες (βιταμίνη C, A, E, K), τα φυτοχημικά όπως τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, τανίνες) (Oroian & Escriche, n.d.)

Τόσο οι φυσικές όσο και οι συνθετικές αντιοξειδωτικές ενώσεις παρουσιάζουν πλήθος βιολογικών δράσεων όπως αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιαθηροσκληρωτικές δράσεις. Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν σημαντική πηγή διατροφικών αντιοξειδωτικών, και περισσότερα από το 85% των ολικών

αντιοξειδωτικών τους αποτελείται από υδρόφιλα μόρια. Από αυτά, σημαντικά μόρια είναι τα φλαβονοειδή, καθώς έχουν σημαντική αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, και αντιοξειδωτική δράση (Tan et al., 2018). Ωστόσο, προστατευτικός ρόλος των αντιοξειδωτικών *in vivo* φαίνεται πως δεν είναι να εξαλείψουν όλες τις ελεύθερες ρίζες, αλλά να περιορίσουν τα επίπεδά τους ώστε να εξουδετερωθούν από ενδογενή συστήματα (Gebicki & Nauser, 2021).

1.10 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα σθένους, με ικανότητα αυτόνομης ύπαρξης ονομάζονται ελεύθερες ρίζες, και προκύπτουν έπειτα από την μεταφορά ενός ηλεκτρονίου με κατανάλωση ενέργειας. Παρά τον μικρό χρόνο ημιζωής τους, η παρουσία του ασύζευκτου ηλεκτρονίου τις καθιστά ιδιαίτερα δραστικές, με αποτέλεσμα να μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε βιομόρια όπως DNA και πρωτεΐνες, αλλά και προκειμένου να συμπληρώσουν το ζεύγος των ηλεκτρονίων τους, δρώντας είτε ως αναγωγικές είτε ως οξειδωτικοί παράγοντες, αλλά και να αντιδράσουν και με άλλες ρίζες σχηματίζοντας προϊόντα χαμηλότερης δραστικότητας (Li et al., 2016).

Η δράση των ελεύθερων ριζών μπορεί να είναι τόσο ευεργετική όσο και επιβλαβής για τα κύτταρα και τους οργανισμούς. Οι ευεργετικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών παρατηρούνται συνήθως σε χαμηλές συγκεντρώσεις και σχετίζονται με φυσιολογικές διεργασίες, όπως η απόκριση στο στρες, η μεταγωγή σήματος η κυτταρική διαφοροποίηση, η φλεγμονή και η απόπτωση (Santo et al., 2016).

Επιπλέον, διεργασίες όπως η ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, η απόπτωση, η ανοσία και η κυτταρική διαφοροποίηση εξαρτώνται από την τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών στο εσωτερικό των κυττάρων, οι οποίες πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα. Όταν η παραγωγή των ελεύθερων ριζών αυξάνεται σε επίπεδα που δε μπορούν να αντισταθμιστούν από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, μπορούν να παρουσιαστούν επιβλαβείς επιδράσεις όταν αλληλεπιδράσουν με σημαντικές κυτταρικές δομές, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα, τροποποιώντας τη δομή και τη λειτουργία τους (Pizzino et al., 2017)

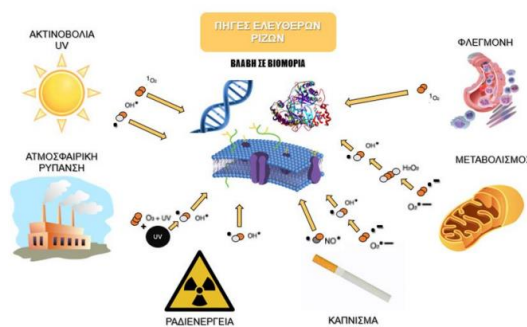
1.10.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε φυσιολογικά ως μεταβολικά παραπροϊόντα των βιολογικών συστημάτων, είτε ως συνέπεια παθολογικών καταστάσεων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν στο κύτταρο μέσω της διαρροής από τις μιτοχονδριακές και μικροσωματικές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Στις ενδογενείς πηγές ελεύθερων ριζών περιλαμβάνονται διαδικασίες όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση, αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης, η φαγοκυττάρωση, η αυτο-οξείδωση των αμινοξέων, ο τραυματισμός επαναιμάτωσης/ισχαιμίας και η δράση οξειδωτικών ενζύμων, ή η δράση του κυτοχρώματος P450, αλλά και η διαδικασία επαγωγής της φλεγμονής, μέσω της ενεργοποίησης των κυττάρων της φυσικής ανοσίας όπως ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και μακροφάγα, έπειτα από φλεγμονή, οδηγώντας στην απελευθέρωση προφλεγμονώδων κυτταροκινών. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση ευθύνεται για μεγάλο ποσοστό των παραγόμενων ελεύθερων ριζών στον οργανισμό καθώς Υπό φυσιολογικές συνθήκες, περίπου το 1-3% του οξυγόνου που καταναλώνεται από το σώμα για την παραγωγή ενέργειας (ATP) θα μετατραπεί σε $O_2\cdot-$ ή κάποια άλλη μορφή. Επιπλέον, υπό φυσιολογικές συνθήκες το κυτόχρωμα P450 ευθύνεται για την παραγωγή ελεύθερων ριζών στο ήπαρ καθώς μετατρέπει το παραγόμενο $O_2\cdot-$ σε H_2O_2 , καθώς και μέσω της αποτοξικοποίησης ουσιών. Επιπλέον, ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων από την αερόβια αναπνοή οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών από τα υπεροξειδισώματα, με σημαντικότερες το μονήρες οξυγόνο και το υποχλωριώδες οξύ, τα οποία αποτελούν σημείο παραγωγής των περισσότερων οξειδωτικών μορίων (Gulcin, 2020).

Η εξωγενής παραγωγή των ελευθέρων ριζών μπορεί να προκληθεί από την έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους, καυσαέρια, ηλεκτρομαγνητική και υπεριώδης ακτινοβολία. Η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να αποτελέσει πηγή παραγωγής $OH\cdot$ και $H\cdot$ εξαιτίας της θραύσης που δημιουργείται στο δεσμό O-H στο νερό, καθώς απορρόφησή της οδηγεί σε διέγερση των ηλεκτρονίων του. Η ρίζα $OH\cdot$ είναι ιδιαίτερα δραστική και μπορεί να αντιδράσει με σχεδόν όλα τα μόρια των οργανισμών, προκαλώντας βλάβες τόσο στο σημείο σχηματισμού της όσο και σε μεγάλη απόσταση από αυτό (Pizzino et al., 2017). Επιπλέον, το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, καθώς και βιομηχανικά απόβλητα αποτελούν

σημαντικές εξωγενείς πηγές παραγωγής. Επίσης, πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών μπορούν να αποτελέσουν φάρμακα και άλλες ξενοβιοτικές ουσίες, όπως τοξίνες και εντομοκτόνα σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες μέσω της διαδικασίας αποτοξικοποίησής τους, το αλκοόλ, καθώς και η διατροφή διότι οδηγούν στο σχηματισμό ηλεκτρονιόφιλων μεταβολιτών (Lin et al, 2019).



Εικόνα 6: Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές των ελεύθερων ριζών (Halliwell and Gutteridge 2015)

1.10.2 ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Παρά τις επιβλαβείς τους επιδράσεις, η δράση των ελεύθερων ριζών μπορεί να επιφέρει ευεργετικές επιδράσεις στον οργανισμό.

Όταν διατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις, οι ελεύθερες ρίζες επιφέρουν ωφέλιμα αποτελέσματα για τον οργανισμό όπως την παραγωγή ενέργειας, τη δημιουργία κυτταρικών δομών και την καταπολέμηση βακτηριακών εισβολών. Κατά τη φλεγμονή, τα φαγοκύτταρα σχηματίζουν και αποθηκεύουν ελεύθερες ρίζες, τις οποίες απελευθερώνουν κατά την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών είναι ιδιαίτερα σημαντικός σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών όπως είναι η φλεγμονώδης αντίδραση κατά την ανοσιακή απόκριση, η κυτταρική σηματοδότηση, η προσκόλληση λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και των ουδετερόφιλων η οποία παρεμποδίζεται από αυτές (Li et al, 2016).

Εξίσου σημαντικός είναι ο ρόλος των ελεύθερων ριζών σε σηματοδοτικά μονοπάτια, όπου αποτελούν τμήμα σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών σε διάφορους τύπους κυττάρων, όπως ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, καρδιακά μυοκύτταρα, και θυρεοειδικό ιστό. Από τις σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που δρουν ως σηματοδοτικά μόρια είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), ένας

σημαντικό μόριο μεταγωγής σήματος σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως η νευροδιαβίβαση, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, και η χάλαση των λείων μυικών ινών.

Η διαρκής δράση των ελεύθερων ριζών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης εξαιτίας λιπιδικής υπεροξειδωσης, απώλεια της βιολογικής δράσης των πρωτεϊνών, αλλά και μεταλλάξεις στο DNA και τελικά κυτταρικό θάνατο, που μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω θανάτωση γειτονικών κυττάρων μέσω της απελευθέρωσης φλεγμονοδών κυτταροκινών (Pisochi et al, 2021). Η αλληλεπίδραση των ελεύθερων ριζών με τα παραπάνω βιομόρια είναι αναπόφευκτη διότι αυτές παράγονται διαρκώς στα κύτταρα, και παρά την παρουσία προστατευτικών μηχανισμών οι οποίοι δρουν ενάντια στα επιβλαβή αποτελέσματα των ελεύθερων ριζών είναι δυνατόν οι βλάβες αυτές να συσσωρευτούν (Li et al, 2016).

Σε υψηλές συγκεντρώσεις οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αποτελέσουν σημείο έναρξης, αλλά και να επηρεάσουν και στην εξέλιξη διάφορων παθοφυσιολογιών, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο αλλά και στην απόπτωση των υγιών κυττάρων, στην πρόκληση φλεγμονής, και επηρεάζοντας τις κυτταρικές λειτουργίες. Οι παραπάνω αλλοιώσεις μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση εκφυλιστικών ασθενειών, όπως καταρράκτης, καρκίνος μέσω μη-γενοτοξικών μηχανισμών, καθώς μπορούν να οδηγήσουν στη θανάτωση των νευρώνων και των αστροκυττάρων μέσω απόπτωσης και νέκρωσης, νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer, αποτελώντας ένα από τα αρχικά γεγονότα της νόσου, και καθώς και γήρανση (Manoharan et al, 2016).

Ωστόσο, εάν οι ελεύθερες ρίζες θα δράσουν ευεργετικά ή βλαπτικά στα κύτταρα του οργανισμού εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ του ρυθμού παραγωγής τους και της δράσης των μηχανισμών απομάκρυνσής τους, έχοντας έτσι διττό ρόλο (Sharma et al, 2012).

1.10.3. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Στο παρελθόν έχουν αποδοθεί διάφοροι ορισμοί στο οξειδωτικό στρες που όμως τονίζουν τον επιβλαβή του χαρακτήρα. Το 1985 ο Helmut Sies χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο σε άρθρο του, σύμφωνα με το οποίο “το οξειδωτικό είναι μια διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών – αντιοξειδωτικών ενώσεων υπέρ των

πρώτων”. Η ανισορροπία αυτή μπορεί να προκύψει είτε από υπερπαραγωγή ROS, είτε από μειωμένη δράση ή ποσότητα αντιοξειδωτικών μορίων (Li et al., 2016). Σε ήπια επίπεδα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβη των μακρομορίων (λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες) και δυσλειτουργία του κυττάρου, ενώ υπέρμετρο οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, αυτοφαγίας, αλλά και να ευθύνεται για μεγάλο αριθμό παθοφυσιολογικών καταστάσεων που αφορούν την έναρξη και/ή την εξέλιξη πολλών χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, το εγκεφαλικό επεισόδιο, η αθηροσκλήρωση, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η νόσος Alzheimer, η νόσος Parkinson, αλλά και στην επίσπευση της γήρανσης (Luo et al., 2019). Ωστόσο, το οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει και ευεργετικές επιδράσεις στον οργανισμό, καθώς μικρή, παροδική αύξησή του μπορεί να αποτελέσει σηματοδοτικό μηχανισμό για τα κύτταρα, οδηγώντας σε φυσιολογικές κυτταρικές αποκρίσεις (Li R. Et al., 2016).



Εικόνα 7: Οξειδωτικό στρες και παθολογία (Rahman et al., 2012)

1.11 ΑΝΤΙΟΞΕΙΩΔΩΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕΛΙΟΥ

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος για πολλούς επιστήμονες τα τελευταία χρόνια. Η παρουσία ασκορβικού οξέος φαίνεται να εξουδετερώνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου, πράγμα που σημαίνει ότι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου εξουδετερώνεται αμέσως μετά τον σχηματισμό τους. Επιπλέον φλαβονοειδείς και φαινολικές ενώσεις εμποδίζουν τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών δημιουργώντας σύμπλοκα με ελεύθερα ιόντα σιδήρου ή χαλκού.

Η περιεκτικότητα του μελιού σε συστατικά όπως οργανικά οξέα, πρωτεΐνες, ιχνοστοιχεία, μέταλλα, βιταμίνες κ.ά. ενισχύει την αντιοξειδωτική του ικανότητα. (Oroian et al., 2018). Επιπρόσθετα έχει διαπιστωθεί ότι το μέλι προστατεύει τα τρόφιμα από οξειδωτικές αντιδράσεις, που δημιουργούνται έπειτα από ηλικιακή ακτινοβολία, υψηλές θερμοότητες και έπειτα από επαφή με ορισμένα μέταλλα. Στις οξειδωτικές αντιδράσεις περιλαμβάνονται η οξείδωση των λιπιδίων και οι αντιδράσεις ενζυμικής αμαύρωσης. (Fortuna et al., 2006). Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα της συνδυασμένης δραστηριότητας ενός ευρέως φάσματος ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων φαινόλων, πεπτιδίων, οργανικών οξέων, ενζύμων, προϊόντων που ενισχύουν την «Αντίδραση Maillard» και πιθανώς άλλων δευτερευόντων συστατικών. Οι φαινόλες συμβάλλουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού αλλά δεν ήταν αποκλειστικά υπεύθυνες γι' αυτό (Nagai et al., 2017).

1.12 ΜΕΛΙ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

Το μέλι εδώ και χιλιάδες χρόνια έχει συνδεθεί με πλήθος ευεργετικών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου. Η υψηλή του περιεκτικότητα σε σάκχαρα αποτελεί πηγή ενέργειας είτε με τον άμεσο μεταβολισμό της γλυκόζης είτε με την παραγωγή γλυκογόνου στο ήπαρ των υπόλοιπων ολισακχαριτών, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο υποκατάστατο της ζάχαρης. Άλλες ουσίες όπως η χολίνη και η ακετυλοχολίνη φαίνεται να βοηθούν στην καρδιακή και εγκεφαλική λειτουργία ενώ συμμετέχουν στο σχηματισμό της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα να αποτελούν σημαντικό νευροδιαβιβαστή (Fortuna et al., 2006).

Σημαντικό ρόλο παίζει στη δημιουργία ινών κολλαγόνου και συνδετικού ιστού, με αποτέλεσμα στο τραυματισμένο δέρμα να αναγεννώνονται τα επιθηλιακά κύτταρα και να αυξάνονται οι ινοβλάστες της επιφάνειας βιβλιογραφία. Επιπλέον ο ρόλος του υπεροξειδίου του υδρογόνου βοηθά στη διέγερση του υποδοχέα της ινσουλίνης, που οδηγεί στην αύξηση της πρωτεΐνης και τον πολλαπλασιασμό νέων κυττάρων της επιδερμίδας (Karaman et al., 2008).

Το μέλι επιδρά στο γαστρεντερικό σύστημα, βοηθώντας στη διάσπαση των οξέων στο στομάχο σε ασθενείς με εξασθενημένο οργανισμό, βελτιώνοντας την πέψη και

την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από το έντερο. Επιπλέον, συμβάλει στη λειτουργία της καρδιάς λόγω της παρουσίας χολίνης και ακετυλοχολίνης όπως ήδη αναφέρθηκε, ενώ τεράστια οφέλη έχουν διαπιστωθεί σε υπερτασικούς ασθενείς, εξαιτίας του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης (Gliszczyńska-Świąło et al., 2015).

2.Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εκτίμηση της πιθανής αντιοξειδωτικής ικανότητας 10 δειγμάτων μελιού που έχουν παραχθεί στην Ελλάδα από μικρούς παραγωγούς. Τα δείγματα εξετάσθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους σε πολυφαινόλες, την αντιοξειδωτική και την αναγωγική τους ικανότητα.

3.Υλικά και μέθοδοι

3.1.Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα μελιών προέρχονται από την ευρύτερη περιοχή της Πίνδου και συλλέχθηκαν το καλοκαίρι του 2021 (πίνακας 1).

Πίνακας 1 Δείγματα μελιών (τύπος και ημερομηνία συγκομιδής).

<u>Τύπος μελιού</u>	<u>Ημερομηνία Συγκομιδής</u>
Δάσους με υψηλά ποσοστά μελιτώματος βελανιδιάς	Ιούλιος 2021
Ανθόμελο (1)	Ιούλιος 2021
Ανθόμελο (2)	Ιούλιος 2021
Ανθόμελο (3)	Ιούλιος 2021
Βελανιδιά (1)	Αύγουστος 2021
Βελανιδιά (2)	Αύγουστος 2021
Γαλάζιο αγκάθι (1)	Αύγουστος 2021
Γαλάζιο αγκάθι (2)	Αύγουστος 2021
Βότανα και αγριολούουδα	Αύγουστος 2021
Δάσους	Ιούλιος 2021

3.2 Επεξεργασία δειγμάτων

Έγινε αραίωση του δείγματος 1:2 με dH₂O και ακολούθησε θέρμανση για 5 λεπτά στους 40°C. Τα δείγματα διατηρήθηκαν για δύο ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, με το πέρας των δύο ημερών η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

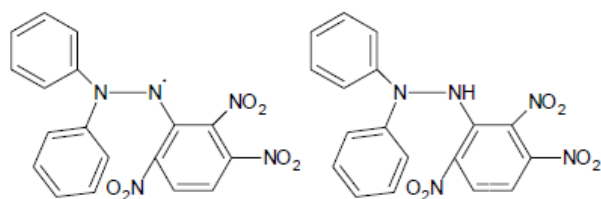
3.3 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο μέσω του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu (FC) (Merck, Darmstadt, Germany). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων (P₂W₁₈O₆₂-7 → H₄P₂W₁₈O₆₂-8, H₂P₂Mo₁₈O₆₂-6 → H₆P₂Mo₁₈O₆₂-7). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) μπλε χρώσης που

απορροφά στα 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 , αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστήριου FC και του προϊόντος της αντίδρασης. Σε erppendorf προστίθεται αρχικά dH_2O , το αντιδραστήριο Folin-Cicalteu και το προς εξέταση δείγμα. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 3 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθεται διάλυμα Na_2CO_3 το οποίο διατηρεί την αλκαλικότητα της αντίδρασης και εκ νέου dH_2O . Το μίγμα αναδεύεται και επωάζεται για 1 ώρα στο σκοτάδι. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο ως προς το τυφλό δείγμα. Κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα δοκιμάζεται εις τριπλούν. Εξετάζουμε ακόμη και την οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστήριου FC η οποία αφαιρείται από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης. Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάζεται με συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 και 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ γαλλικού οξέος. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GAE (Gallic Acid Equivalents)/g εκχυλίσματος) (Abramovič et al., 2017).

3.4 Μέθοδος DPPH•

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH•) (Εικ. 5). Το διάλυμα αυτής της ρίζας διαθέτει έντονο μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Με τη προσθήκη ουσίας που διαθέτει αντιοξειδωτική ικανότητα η ρίζα DPPH• ανάγεται λαμβάνοντας ένα άτομο υδρογόνου (ή ένα e^-) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνη (Εικ. 5) η οποία έχει κίτρινο χρώμα. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του δείγματος αλλά και τη μείωση της οπτικής απορρόφησης. Όσο πιο έντονη είναι η μείωση, τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.



Εικόνα 4: Δεξιά: Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζυλ (DPPH•). Αριστερά: Χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης

Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με τη παρασκευή της ρίζας του DPPH• σε συγκέντρωση 2mM. Στη συνέχεια σε erpendorf προστίθενται η εξεταζόμενη ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις, μεθανόλη και τέλος η ρίζα DPPH•. Ακολουθεί έντονη ανάδευση, επώαση για 20 λεπτά στο σκοτάδι και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος (Karydas et al., 2020).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίσθηκε ως εξής:

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100$$

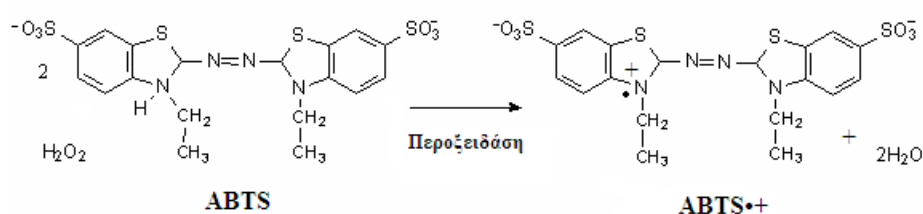
RSC = radical scavenging capacity

3.5 Μέθοδος ABTS•+

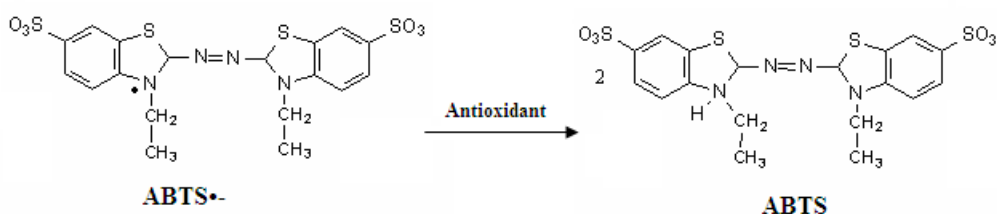
Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS•+. Η ρίζα αυτή παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (Εικ. 6). Η ουσία προστίθεται μετά το σχηματισμό της ρίζας. Η ρίζα του ABTS•+ φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί ουσία με αντιοξειδωτική ικανότητα τότε η ρίζα του ABTS•+ ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 730 nm να ελαττώνεται (Εικ. 7).

Για τη δημιουργία της ρίζας παρασκευάζεται διάλυμα ABTS σε συγκέντρωση 2 mM από το οποίο στην αντίδραση προστίθενται 500 μl. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται

διάλυμα H₂O₂ 30% 8.8 M το οποίο αραιώνεται ώστε στην αντίδραση με τη προσθήκη 50 μl η συγκέντρωση να είναι 30 μM. Τέλος προστίθενται 50 μl ενζύμου HRP αραίωσης 1:20 από το αρχικό διάλυμα. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εξεταζόμενου εκχυλίσματος/ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος (Kouka et al., 2019).



Εικόνα 5 Παραγωγή της ρίζας του ABTS•- μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H₂O₂.



Εικόνα 6 Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του ABTS•+.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίστηκε ως εξής:

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100$$

RSC = radical scavenging capacity

3.6 Superoxide Radical

Έχει παρατηρηθεί ότι η ρίζα $O_2^{\cdot-}$ μπορεί να οδηγήσει σε θανάτωση των κυτάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Είναι επίσης πιθανό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι $O_2^{\cdot-}$ προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το $O_2^{\cdot-}$ μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT^{2+} με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλέ NBT. Όσο πιο έντονος είναι ο αποχρωματισμός τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα της ουσίας. Στην αντίδραση αρχικά προστίθεται η προς εξέταση ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 16mM, pH 8.0 το οποίο αραιώνεται από διάλυμα 1M. Ενώ τέλος προστίθενται NBT 300 μ M, NADH 468 μ M και PMS 60 μ M. Τα δείγματα επωάζονται στο σκοτάδι για 5 λεπτά κι έπειτα μετρούνται φασματοφωτομετρικά στα 560 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος (Mylonas & Kouretas, 1999).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίσθηκε ως εξής:

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100$$

RSC = radical scavenging capacity

3.7 Hydroxyl Radical

Η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot OH$) είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα. Είναι ιδιαίτερα επιβλαβής ρίζα, ικανή να βλάψει βιομόρια των ζωντανών κυτάρων. Αυτές οι ρίζες συνδιάζονται με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλούν θραύση των κλώνων που οδηγούν σε καρκινογέννεση, μεταλλαξιγέννεση και κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα απομάκρυνσης ριζών υδροξυλίου ($\cdot OH$) ενός εκχυλίσματος σχετίζεται με την αντιοξειδωτική του δράση. Η επίδραση των εκχυλισμάτων σε ρίζες υδροξυλίου

δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη αποικοδομείται κατόπιν έκθεσής της σε ρίζες υδροξυλίου που παράγονται από την αντίδραση Fenton. Για την δημιουργία της αντίδρασης αρχικά παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα 0.2M, pH 7.4. Στη συνέχεια προστίθενται 2-deoxyribose 10mM, διάλυμα FeSO₄-EDTA 10mM, H₂O₂ 10mM το οποίο έχει αραιωθεί από stock 8,8 M, dH₂O και το δείγμα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και επώαση για 1 ώρα σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C. Με το πέρας της επώασης ακολουθεί η προσθήκη Trichloroaceticacid (TCA) 2,8% w/v και TBA 1%. Έπειτα τα δείγματα βράζουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 95-100 °C και κρύνουν σε πάγο για 5 λεπτά. Με το πέρας της επώασης ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 3000 rpm και τέλος φωτομέτρηση στα 520 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος (Mylonas & Kouretas, 1999).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίστηκε ως εξής:

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100$$

RSC = radical scavenging capacity

3.8 Reducing power assay

Η αναγωγική ικανότητα μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη αυτής. Ενώσεις με αναγωγική ισχύ υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, έτσι ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον Fe³⁺ και τον ανάγουν σε Fe²⁺, ο οποίος όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο προκύπτει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλέ ανάλογα με την αναγωγική ικανότητα της προς εξέταση ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700 nm, τόσο υψηλότερη είναι και η αναγωγική ικανότητα. Αρχικά σε eppendorf 1,5ml προστίθεται το δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί στο ρυθμιστικό

διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση 0.2M και pH 6.6 και 1% w/v Potassium ferricyanide. Έπειτα πραγματοποιείται ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά στους 50 °C. Με το τέλος της επώασης προστίθεται 10% w/v Trichloroaceticacid (TCA) και οι αντιδράσεις φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στα 3000 rpm. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο erpendorf στο οποίο προστίθενται dH₂O και 0.1 % w/v Ferricchloride. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με 10 λεπτή επώαση στη σκοτάδι και φωτομέτρηση στα 700 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος (Grundler et al., 2020).

Η αναγωγική ικανότητα υπολογίστηκε ως εξής:

AU_{0,5}= απορρόφηση ουσίας - απορρόφηση control

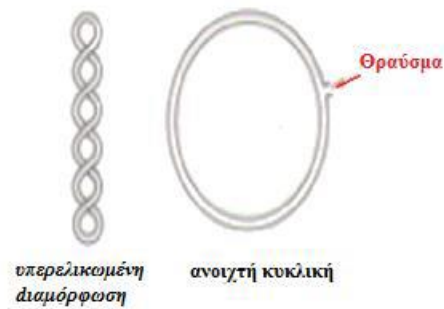
AU = Absorbance Unit

3.9 Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου (ROO[•]) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για παρατήρηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων ή βιοδραστικών ουσιών απέναντι στην επαγόμενη από οξειδωτικούς παράγοντες και ένζυμα, πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Βασίζεται στο ότι το πλασμιδιακό DNA έχει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με τον βαθμό υπερελίκωσής του. Οι διαμορφώσεις είναι οι εξής (Εικ. 8):

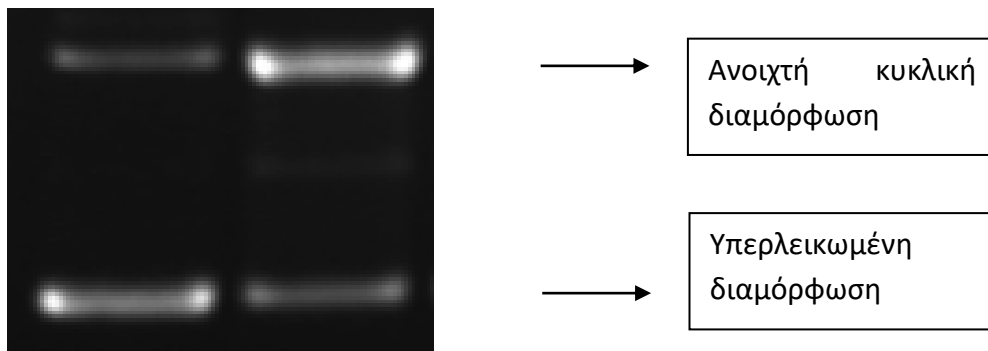
- Υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation): το πλασμιδιακό DNA δεν έχει θραύσματα και αποτελεί την πιο συμπακνωμένη του μορφή.
- Ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation): μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλινα σπασίματα από παράγοντες όπως οι ελεύθερες ρίζες.

Γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation): δημιουργείται όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα. Όσο πιο μικρή είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA τόσο πιο



Εικόνα 7 Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA

γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αγαρόζης και εμφανίζεται πιο κάτω στο πήκτωμα της αγαρόζης. Επομένως η υπερλεικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτη, δεύτερη η γραμμική και τρίτη η ανοιχτή κυκλική όπως φαίνεται και στην εικόνα 9.



Εικόνα 8 Πηκτή αγαρόζης.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με τη προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο χρησιμοποιείται για τη συσκευή ηλεκτροφόρησης αλλά και τη παρασκευή της πηκτής αγαρόζης (πυκνότητας 0,8%). Ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων (PBS, plasmid DNA, AAPH και η ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις) και η επώασή τους στους 37°C για 45 λεπτά. Με το πέρας της επώασης γίνεται προσθήκη loading buffer και οι αντιδράσεις τοποθετούνται στη πηκτή αγαρόζης. Έπειτα ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 80V για 1 ώρα. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση γίνεται χρώση της πηκτής με Βρωμιούχο Αιθίδιο για 30 λεπτά και έπειτα πλύση με H₂O για 30 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Τέλος, γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων σε ειδικά διαμορφωμένο πρόγραμμα (Veskoukis et al., 2020).

3.10 Στατιστική Ανάλυση

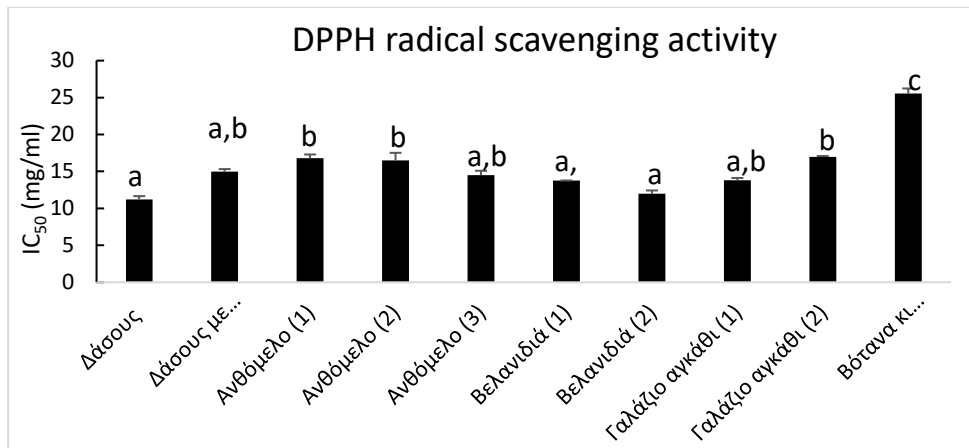
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις αναλύθηκαν με το λογισμικό SPSS 20. Πιο συγκεκριμένα έγινε χρήση του test one-way ANOVA. Σε όλες τις αναλύσεις το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ήταν το $p < 0.05$. Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μέσος όρος \pm SD. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τα αποτελέσματα τριών (3) ανεξάρτητων πειραμάτων.

4. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα των μεθόδων βασίζονται στην αναστολή των ριζών DPPH•, ABTS•+, OH•, O₂ και ROO• και εκφράζονται σε IC₅₀. Το IC₅₀ είναι η συγκέντρωση που χρειάζεται το κάθε δείγμα ώστε να εξουδετερώσει την εκάστοτε ρίζα κατά 50%. Τα δείγματα με χαμηλότερη τιμή IC₅₀ έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα γράμματα πάνω από κάθε στήλη προέκυψαν από στατιστική ανάλυση και κάθε διαφορετικό γράμμα υποδηλώνει σημαντική στατιστική διαφορά.

4.1 Μέθοδος DPPH

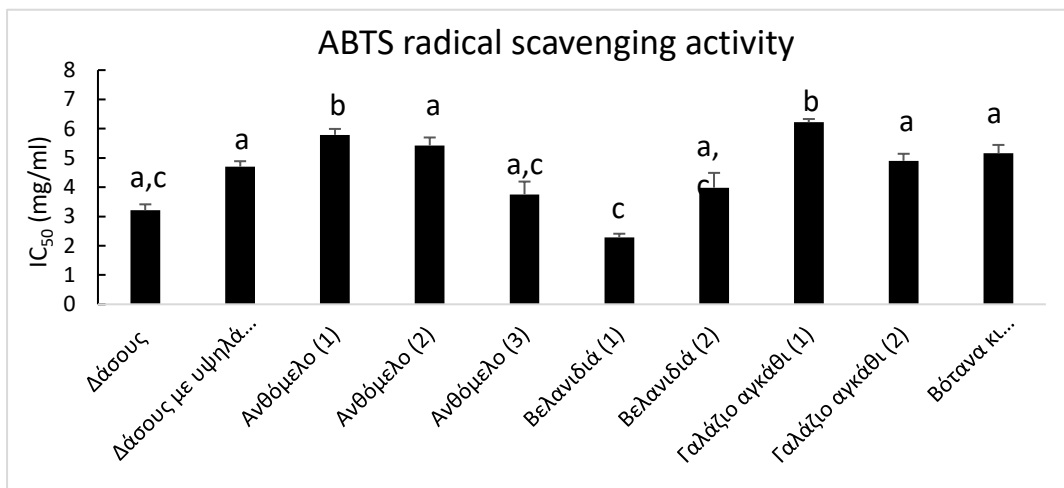
Στο Διάγραμμα 1 απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH• από τα δέκα μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (25, 12.5, 6.25, 3.125 και 1.56 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε, όσο χαμηλότερη η τιμή IC₅₀ τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι το μέλι Δάσους και το μέλι Βελανιδιάς (2) είναι εκείνα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Την χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα έχει το μέλι βοτάνων και αγριολούλουδων.



Διάγραμμα 1: Αποτελέσματα μεθόδου DPPH. Τα αποτελέσματα έχουν εκφρασθεί σε $IC_{50} \pm SD$.

4.2 Μέθοδος ABTS

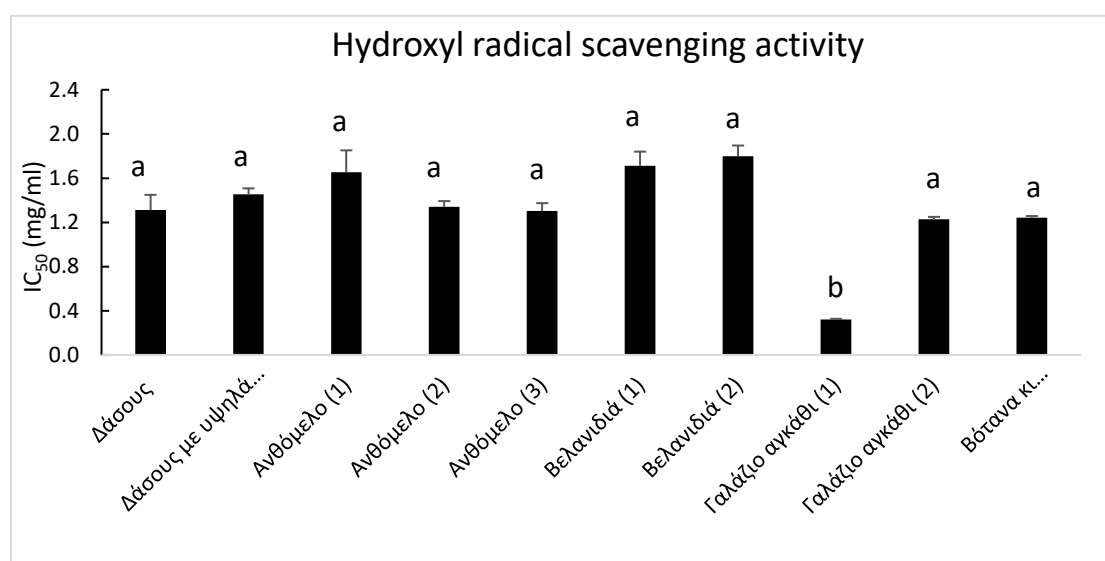
Στο Διάγραμμα 2 απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS από τα δέκα μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (6.25, 3.125, 1.56 0.78 και 0.39 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όσο χαμηλότερη η τιμή IC_{50} τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι το μέλι Βελανιδιάς (1) είναι εκείνο με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Το ανθόμελο (1) και το γαλάζιο Αγκάθι (1) έχουν την χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Διάγραμμα 2: Αποτελέσματα μεθόδου ABTS. Τα αποτελέσματα έχουν εκφρασθεί σε $IC_{50} \pm SD$.

4.3 Μέθοδος Hydroxyl Radical

Στο Διάγραμμα 3 απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του OH από τα δέκα μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (3.125, 1.56, 0.78, 0.39 και 0.19 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όσο χαμηλότερη η τιμή IC_{50} τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από αυτό το διάγραμμα προκύπτει ότι το γαλάζιο αγκάθι (1) έχει τις χαμηλότερες τιμές IC_{50} , άρα και την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Ανάμεσα στα υπόλοιπα μέλια δεν παρατηρείτε στατιστικά σημαντική διαφορά.

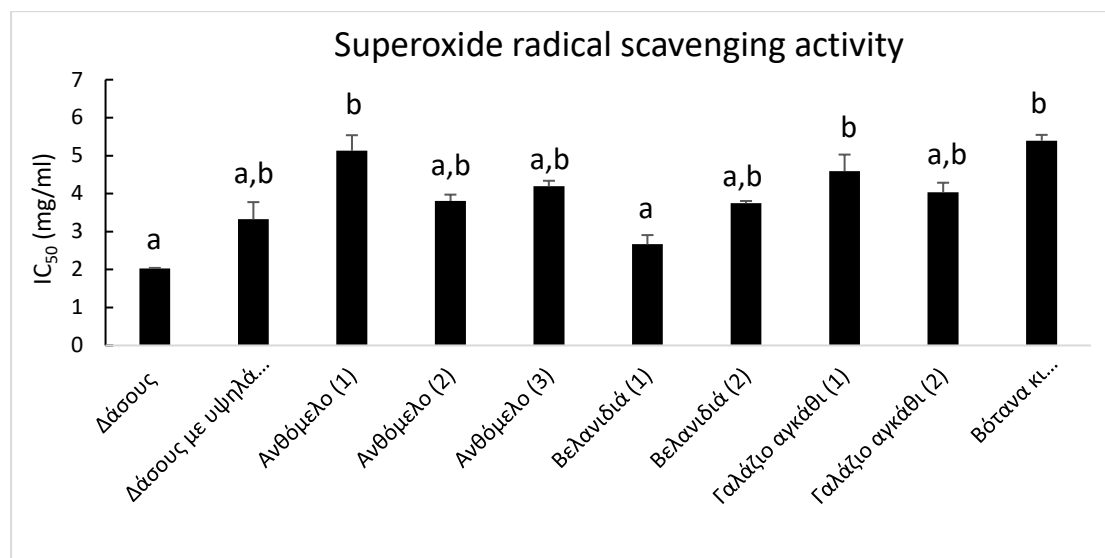


Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα μεθόδου Hydroxyl radical. Τα αποτελέσματα έχουν εκφρασθεί σε $IC_{50} \pm SD$.

4.4 Μέθοδος Superoxide Radical

Στο Διάγραμμα 4 απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του O_2 από τα δέκα μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (12.5, 6.25, 3.125, 1.56 και 0.78 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όσο χαμηλότερη η τιμή IC_{50} τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι το μέλι Δάσους και το μέλι Βελανιδιάς (1) είναι εκείνα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Το ανθόμελο (1), το γαλάζιο

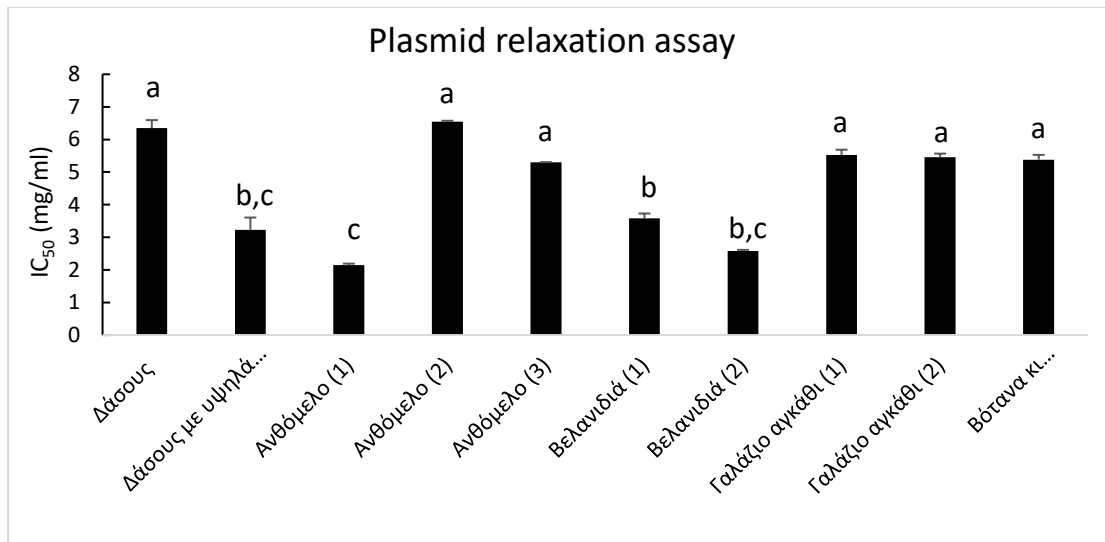
αγκάθι (1) και το μέλι βοτάνων και αγριολούλουδων έχουν την χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα μεθόδου Superoxide radical. Τα αποτελέσματα έχουν εκφρασθεί σε $IC_{50} \pm SD$.

4.5 Η επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

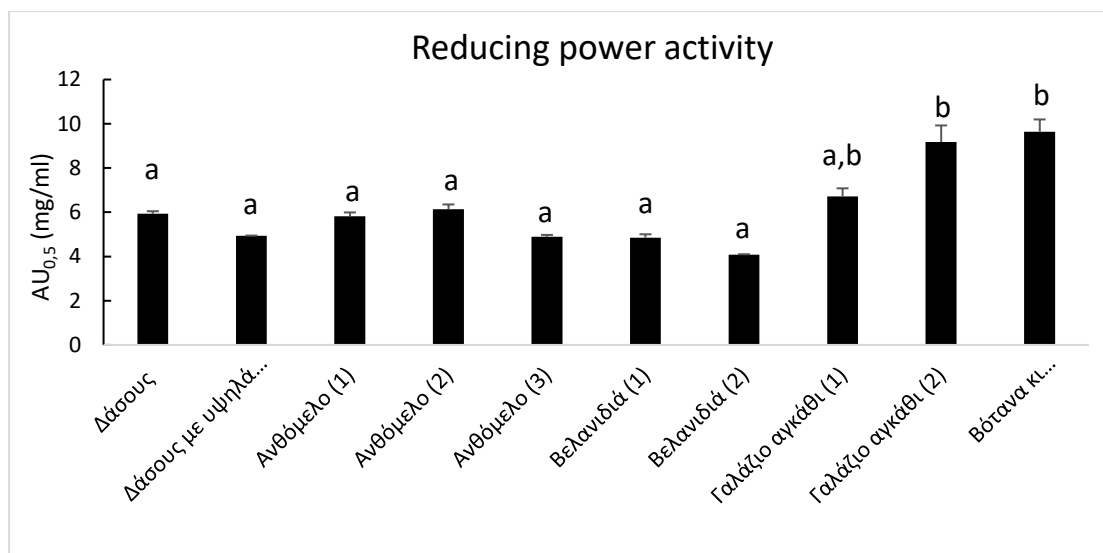
Στο Διάγραμμα 5 απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του ROO• από τα δέκα μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (12.5, 6.25, 3.125, 1.56 και 0.78 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όσο χαμηλότερη η τιμή IC_{50} τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι το μέλι Ανθόμελο (1) είναι εκείνο με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα μεθόδου *Plasmid relaxation assay*. Τα αποτελέσματα έχουν εκφρασθεί σε $IC_{50} \pm SD$.

4.6 Μέθοδος Reducing Power

Η αντιοξειδωτική ικανότητα σχετίζεται άμεσα με την αναγωγική δύναμη. Όσο μικρότερο είναι το $AU_{0,5}$ μίας ουσίας τόσο υψηλότερη είναι και η αναγωγική της δύναμη, άρα τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα θα παρουσιάσει. Στο Διάγραμμα 6 παρατηρήθηκε ότι την χαμηλότερη τιμή $AU_{0,5}$ έχει το δείγμα της Βελανιδιάς (2) παρά το γεγονός ότι διαφέρει στατιστικώς σημαντικά μόνο με τα δείγματα Γαλάζιο αγκάθι (2) και το μέλι βοτάνων.



Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα μεθόδου *Reducing power*. Τα αποτελέσματα έχουν εκφρασθεί σε AU_{0.5}±SD.

4.7 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Δείγμα	mg GAE/g μελιού
Δάσους με υψηλά ποσοστά μελιτώματος βελανιδιάς	0,442
Ανθόμελο (1)	0,379
Ανθόμελο (2)	0,475
Ανθόμελο (3)	0,287
Βελανιδιά (1)	0,388
Βελανιδιά (2)	0,378
Γαλάζιο αγκάθι (1)	0,356
Γαλάζιο αγκάθι (2)	0,412
Βότανα και αγριολούλουδα	0,355
Δάσους	0,184

Πίνακας 2: Αποτελέσματα συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου

Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των δειγμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό δείγμα και εκφράζεται ως mg GAE (Gallic Acid Equivalents)/g δείγματος. Στον Πίνακα 5 παρατηρήθηκε ότι το ανθόμελο (2) και το γαλάζιο αγκάθι (2) είναι αυτά που παρουσιάζουν το υψηλότερο πολυ φαινολικό περιεχόμενο. Τα υπόλοιπα διακυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα.

Συζήτηση

Μέθοδος	Folin-Ciocalteu	DPPH	ABTS	Hydroxyl Radical	Superoxide Radical	Peroxyl Radical	Reducing Power
Μονάδες	mg GAE/g	IC ₅₀ (mg/ml) ±SD					AU _{0.5} (mg/ml) ±SD
Δείγμα							
Δάσους	0.184	11.2±0.62	3.21±0.28	1.31±0.2	2.02±0.03	6.35±0.34	5.94±0.15
Δάσους με υψηλά ποσοστά μελιτώματος Βελανιδιάς Ανθόμελο (1)	0.442	15.0±0.47	4.7±0.26	1.45±0.08	3.32±0.64	3.23±0.53	4.93±0.02
Ανθόμελο (2)	0.379	16.8±0.74	5.79±0.28	1.65±0.28	5.13±0.58	2.14±0.07	5.81±0.25
Ανθόμελο (3)	0.475	16.5±1.44	5.42±0.39	1.34±0.07	3.80±0.24	6.54±0.04	6.13±0.3
Βελανιδιά (1)	0.287	14.5±0.83	3.75±0.62	1.10±0.1	4.19±0.2	5.30±0.01	4.88±0.13
Βελανιδιά (2)	0.388	13.8±0.03	2.29±0.17	1.71±0.18	2.66±0.34	3.59±0.21	4.85±0.22
Γαλάζιο αγκάθι (1)	0.378	12.0±0.62	3.98±0.71	1.79±0.14	3.74±0.08	2.57±0.05	4.09±0.02
Γαλάζιο αγκάθι (2)	0.356	13.8±0.44	6.22±0.15	0.322±0.01	4.59±0.61	5.52±0.23	6.72±0.51
Βότανα κι Αγριολούλουδα	0.412	17.0±0.15	4.90±0.34	1.22±0.03	4.03±0.35	5.45±0.16	9.17±1.06
	0.355	25.6±0.94	5.15±0.4	1.24±0.02	5.39±0.22	5.38±0.21	9.64±0.79

Table 3: Συνολικά αποτελέσματα μελέτης

Σε μια κοινωνία που όλοι στρέφονται προς την υγιεινή διατροφή και την κατανάλωση τροφίμων χαμηλής θερμιδικής περιεκτικότητας φαίνεται ότι το μέλι κερδίζει όλο και περισσότερο την προτίμηση των καταναλωτών. Η γεύση του και το χρώμα του ποικίλει ανάλογα με την περιοχή, εξαιτίας των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών αλλά και των φυτών που συμμετέχουν στην παρασκευή του (Jean Prost, B., 2014). Μελέτες έχουν αναδείξει την ευεργετική επίδραση του στην ανθρώπινη υγεία, όπου μεταξύ άλλων οφείλεται στην αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική του ικανότητα (Jean Prost., P, 2014; Εμμανουήλ Ν., 2014).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας 10 δείγματα μελιού με διαφορετικό ανθικό τίτλο. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάδειξη γηγενών ποικιλιών μελιού λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν *7 in vitro cell free* τεχνικές. Πιο συγκεκριμένα έγινε εκτίμηση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου, της ικανότητας αναστολής των ριζών DPPH, ABTS, Ρίζα υδροξυλίου και Ρίζα σουπεροξειδίου, της αναγωγικής ικανότητας μέσω της μεθόδου Reducing Power και της ικανότητας των δειγμάτων να προστατεύσουν το DNA από θραύσματα προκαλούμενα από ρίζες περοξυλίου (Peroxyl Radical).

Στην μέθοδο αναστολής της ρίζας DPPH την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα φαίνεται να είχαν τα δείγματα Δάσους και Βελανιδιάς (2) αφού είχαν την χαμηλότερη τιμή IC₅₀. Με εξαίρεση τα δείγματα που ήδη αναφέρθηκαν, και το δείγμα μελιού Βότανα κι Αγριολούλουδα που είχε την μεγαλύτερη τιμή IC₅₀, δεν υπήρχε μεγάλη διακύμανση στα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής. Το μέλι Βελανιδιάς (1) ήταν το πιο αποτελεσματικό στη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS αφού έχει το χαμηλότερο IC₅₀. Στη μέθοδο αυτή είναι πιο έντονη η διακύμανση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα δείγματα που ελέγχθηκαν. Έχει προηγηθεί έρευνα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, όπου πραγματοποιήθηκε και η παρούσα εργασία, κατά την οποία έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιώντας τις μεθόδους DPPH και ABTS και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου από διάφορες ποικιλίες μελιών σε μέλια που συλλέχθηκαν στην περιοχή του Ολύμπου (Stagos et al., 2018).. Από τη μελέτη αυτή, προέκυψε ότι τις χαμηλότερες τιμές IC₅₀ παρουσίαζαν μέλια με ανθικό τίτλο το δέντρο ακακία, τη μέντα και ορισμένα βότανα. Στην εν λόγω μελέτη τα ανθόμελα είναι αυτά με τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα παρά το γεγονός ότι στην παρούσα εργασία δεν ισχύει κάτι τέτοιο (Stagos et al., 2018). Οι Berconcelj et.al μελέτησαν 50 συνολικά μέλια από την Σλοβενία, 5 διαφορετικών κατηγοριών μεταξύ των οποίων και 10 μέλια Βελανιδιάς τα οποία είχαν εύρος IC₅₀ 7.8-14 mg/ml (Bertoncelj et al., 2007a). Στο ίδιο εύρος βρίσκονται και τα μέλια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Μελέτη σε μέλια που παράχθηκαν στην Τουρκία ασχολήθηκε με τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας 23 διαφορετικών τύπων μελιού μέσω της ικανότητας τους να αναστέλλουν τη ρίζα DPPH από την οποία προέκυψε ότι τα μέλια που προέρχονται από δένδρα έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα,

γεγονός που συμφωνεί με τα δικά μας ευρήματα αφού τα μέλια Βελανιδιάς είναι τα πιο αποτελεσματικά όσον αφορά τις μεθόδους DPPH και ABTS (Bertoncelj et al., 2007b).

Η ρίζα υδροξυλίου, είναι μια από τις πιο ενεργές ελεύθερες ρίζες, αφού μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια και προκαλεί θανατηφόρα οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα (Liu et al., 2008). Όλα τα δείγματα της μελέτης έδειξαν να έχουν ισχυρή δράση απέναντι στη ρίζα υδροξυλίου αφού οι τιμές IC_{50} κυμάνθηκαν μεταξύ του 0.32-1.65 mg/ml με πιο δραστικό το μέλι γαλάζιο αγκάθι (1). Σε εργασία τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου του Σαράγιεβο σε δείγματα μελιού της Βοσνίας-Ερζεγοβίνη εκτιμήθηκε το αντιοξειδωτικό προφίλ έναντι ριζών υδροξυλίου και περοξυλίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν έντονη διαφοροποίηση των δειγμάτων όσον αφορά τη ρίζα υδροξυλίου, κάτι που δεν συνέβη στα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας (Tahirović et al., 2017). Στην ίδια δημοσίευση έχει γίνει εκτίμηση της ικανότητας των δειγμάτων να προστατεύσουν το DNA από θραύσματα προκαλούμενα από ρίζες περοξυλίου όπου την υψηλότερη προστατευτική ικανότητα είχαν τα μέλια της κατηγορίας Δάσους. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα καθώς τα δείγματα με τη χαμηλότερη τιμή IC_{50} και άρα την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα είναι τα Ανθόμελο (1) και Βελανιδιά (2).

Όσον αφορά την μέθοδο αναστολής της ρίζας O_2^- παρατηρείται ότι το μέλι δάσους και βελανιδιάς έχουν τις χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλια της μελέτης που τα καθιστά εκείνα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η μείωση της απορρόφησης στα 560 nm με την παρουσία δείγματος υποδεικνύει την αντιοξειδωτική ικανότητα του μίγματος (Robak & Gryglewski, 1988). Οι Küçük et. al μελέτησαν 3 είδη μελιού εκ των οποίων τα 1 είναι δένδρο (καστανιά) και το άλλο ανθόμελο με το μέλι της καστανιάς να είναι αρκετά δραστικό με IC_{50} 5.2 mg/ml (Küçük et al., 2007) .

Στη μέθοδο προσδιορισμού της αναγωγικής ικανότητας, το μέλι Βελανιδιάς (2) ήταν αυτό με την υψηλότερη δράση παρά το γεγονός ότι διαφέρει στατιστικώς σημαντικά μόνο με το Γαλάζιο αγκάθι (2) και το μέλι Βοτάνων κι αγριολούλουδων. Σύμφωνα με τους Gul et al., υπάρχει συσχέτιση της αναγωγικής ικανότητας με την απόχρωση του μελιού, καταλήγοντας στο ότι όσο πιο σκούρο είναι ένα δείγμα τόσο

υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα (Gül & Pehlivan, 2018). Το χρώμα πολλές φορές σχετίζεται με τη γεύση του μελιού, τα σκουρόχρωμα μέλια έχουν πιο έντονη γεύση, καθώς διαθέτουν περισσότερα ιχνοστοιχεία σε κάλιο, νάτριο, σίδηρο, μαγνήσιο, φώσφορο. Αναφορικά θα τονιστεί πως η κατάταξη του χρώματος σε ένα μέλι γίνεται με τη χρήση μιας συσκευής που ονομάζεται Φαντ (Χαριζάνης Π., 2014). Σε αντίθεση με τα σκουρόχρωμα τα ανοιχτόχρωμα μέλια έχουν καλύτερο άρωμα και γεύση. Η υδροξυμεθυλοφουρουράλη ή αλλιώς HMF είναι μια ουσία η οποία μας βοηθάει ανάλογα με τις τιμές που έχει κατά τις μετρήσεις που γίνονται στο μέλι προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυτό προήλθε από τροφοδοσία των μελισσών με ζάχαρη με τεχνητό τρόπο, και όχι με φυσικό (Χαριζάνης Π., 2014). Συγκεκριμένα, πιο σκούρα σε χρώμα μέλια είχαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από ότι τα πιο ανοιχτόχρωμα. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία έχει διαπιστωθεί ότι τα πιο σκούρα μέλια (δάσους, βελανιδιάς) είχαν συνολικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα πιο ανοιχτόχρωμα (μέλια ανθέων) (Gül & Pehlivan, 2018).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπάρχει θετική συσχέτιση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου με την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων, δηλαδή όσο υψηλότερο το συνολικό περιεχόμενο τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα (Karydas et al., 2020). Στην παρούσα εργασία όλα τα δείγματα διακυμάνθηκαν σε ένα σχετικά περιορισμένο εύρος τιμών (0.355-0.475 mg GAE/g μελιού) με εξαίρεση τα δείγματα Ανθόμελο (3) (0.287 mg GAE/g μελιού) και το μέλι Δάσους (0.184 mg GAE/g μελιού). Παρά το γεγονός αυτό, το μέλι Δάσους, είναι το μέλι με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στις μεθόδους αναστολής των ριζών DPPH και Superoxide radical. Επίσης παρατηρήθηκε ότι δείγματα με ίδιο ανθικό τίτλο όπως τα δείγματα Γαλάζιο αγκάθι, Ανθόμελο και Βελανιδιάς διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ τους. Αυτό οφείλεται σε περιβαλλοντικούς και κλιματολογικούς παράγοντες ενώ σχετίζεται άμεσα και με τις τεχνικές των παραγωγών (Liu et al., 2013). Εν κατακλείδι η πλειοψηφία των μεθόδων έδειξε ότι τα μέλια Βελανιδιάς είναι εκείνα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Μελλοντικά, προτείνεται η μελέτη των μελιών σε περισσότερες περιοχές με διαφορετική βιοποικιλότητα, κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες, ώστε να διευρυνθούν οι γνώσεις μας σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των μελιών και να προκύψουν τελικά προϊόντα με μεγαλύτερη προστιθέμενη αξία. Θα μπορούσαν να διεξαχθούν επιπλέον μελέτες αναφορικά με την αντιοξειδωτική

ικανότητα δειγμάτων μελιού από περισσότερα είδη και περιοχές παρέχοντας έτσι γνώση στους παραγωγούς. Αυτή η γνώση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία προϊόντων με υψηλή προστιθέμενη αξία.

Βιβλιογραφία

- Codex Alimentarius (2001). Commission Standards, Codex Standards for Honey, (1981/ revised 1987/revised 2001). *FAO– Rome*. 1–7.
- Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M and Golob T. (2007) Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and color of Slovenian honey. *Food Chem*, 105: 822–828.
- Guler A, Bakan A, Nisbet C and Yavuz, O. (2007) Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food Chem*. 105: 1119–1125
- Sanz ML, Gonzalez M, Lorenzo C, Sanz J and Martinez-Castro I. (2004). Carbohydrate composition and physicochemical properties of artisanal honeys from Madrid (Spain): occurrence of *Echium* sp honey. *J Sci Food Agri*, 84: 1577–1584
- Belouali H, Bouaka M and Hakkou AA. (2008). Determination of Some Major and Minor Elements in the East of Morocco Honeys through Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. *Apiacta*, 43: 17- 24.
- Morse, A. R. and Hooper, T. (1985). *The illustrated encyclopaedia of beekeeping*. E. P. Dutton Inc., N. Y. USA, 421 pp.
- Bouga M., Harizanis, P., Kiliyas, G. and Alahiotis, S. (2005). Genetic divergence and phylogenetic relationships of Honey Bee *A. mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR – RFLP analysis of three mtDNA Segments. *Apidologie*, 36(3):344-353.
- EFSA,2008. Ανακτήθηκε από:
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2008.154r>
- Meo, S.A., Al-Asiri, S.A., Mahesar, A.L., & Ansari, M.J. Role of honey in modern medicine. *Saudi J Biol Sci*. 24(5):975-978. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.12.010. Epub 2016 Dec 24. PMID: 28663690; PMCID: PMC5478293
- Suarez RK, Lighton JR, Joos B, Roberts SP, Harrison JF (1996). "Energy metabolism, enzymatic flux capacities, and metabolic flux rates in flying honeybees". *ProcNatlAcadSci U S A*. 93 (22): 12616
- Rossano R, Larocca M, Polito T, Perna AM, Padula MC, Martelli G, Riccio P (2012). "What Are the Proteolytic Enzymes of Honey and What They do Tell Us? A Fingerprint Analysis by 2-D Zymography of Unifloral Honeys". *PLOS*

ONE, 7 (11): e49164. doi:10.1371/journal.pone.0049164. PMC 3492327. PMID 23145107.

Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 27, 677–689.

Buba, F., Gidado, A., Shugaba, A. (2013). Analysis of biochemical composition of honey samples from North-East Nigeria. *Biochem. Anal. Biochem*, 2 (3), 139. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1009.1000139>. Cantarelli, M.A., Pellerano, R.G.,

EL-Metwally, A.A.E. (2015). *Factors Affecting the Physical and Chemical Characteristics of Egyptia Bee honey*. Ph. D. Thesis, Fac. AgricCairoUniv., 320p.

OroianM., (2013), Measurement, prediction and correlation of density, viscosity, surface tension and ultrasonic velocity of different honey types at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 119, 167-172, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.029>

Oroian, M., Paduret, S., Ropciuc, S., (2018), Honey authentication using rheological and physicochemical properties, *Journal of Food Science and Technology*, 55 (12), 4711-4718, <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3415-4>

Fortuna, T., Juszczak, L., (2006), Rheology of selected Polish honeys. *Journal of Food Engineering*, 75, 43-49, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.049>

Beretta G, Orioli M, Facino RM. (2007) Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA. hy926). *Planta Med.*, 73:1182–9.

Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N. (2006). Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *J Microbiol Methods.*, 64:84–95.

Snowdon JA, Cliver DO. (1996). Microorganisms in honey. *Int J Food Microbiol.*, 31:1–26.

Fortuna, T., Juszczak, L., (2006), Rheology of selected Polish honeys. *Journal of Food Engineering*, 75, 43-49.

Karaman, S., Kayacier, A., (2008), Rheological And Some Physicochemical Characteristics Of Selected Turkish Honeys, *Journal of Texture Studies*, 39, 17-27

Gliszczyńska-Świgło, A., Piotraszewska-Pająk, A., (2015), Directions Of Colour Changes Of Nectar honeys Depending On Honey Type And Storage Conditions, *Journal of Apicultural Science*, 59 (2), 51-61.

Hendrikx, P., Debin, M., Chauzat, M.P. (2010). Bee mortality and bee surveillance in Europe. *EFSA Report* 1–278.-doi:10.2903/j.efsa.2008.154r

Harissis, H.V., & Harissis, A.V. (2009). Apiculture in the Prehistoric Aegean. Minoan and Mycenaean Symbols Revisited. Oxford: *BAR International Series No 1958*, p. 1-95.

Tchoumboue, J., J. Awah-Ndukum, A. Fonteh Florence, N.D. Dongock, J. Pinta and A. Mvondo Ze (2007). Physico-chemical and microbiological characteristics of honey from the sudano-guinean zone of West Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 6(7): 908-913.

Yadav, D., Mishra, M., Rana, S., Subramani, S.K., & Prasad, G. (2017). Study of biochemical and oxidative stress markers in the first-degree relatives of persons with type 2 diabetes stratified by glucose tolerance test. *Prog Nutr.*, 19: 183-90.

Clement, H. (2007). *Σύγχρονη μελισσοκομία*. Αθήνα: ΨΥΧΑΛΟΥ

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8416763-8416763.doi:10.1155/2017/8416763

Abramovič, H., Grobin, B., Ulrih, N. P., & Cigić, B. (2017). The methodology applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu assays has a large influence on the determined antioxidant potential. *Acta Chimica Slovenica*, 64(2), 491-499.

Karydas, C., Iatrou, M., Kouretas, D., Patouna, A., Iatrou, G., Lazos, N., . . . Zartaloudis, Z. (2020). Prediction of antioxidant activity of cherry fruits from UAS multispectral imagery using machine learning. *Antioxidants*, 9(2), 156.

Kouka, P., Tekos, F., Valta, K., Mavros, P., Veskoukis, A. S., Angelis, A., . . . Kouretas, D. (2019). Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines. *Oncology Reports*, 42(6), 2814-2825.

Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo (Athens, Greece)*, 13(3), 295-309.

Noor, N., Sarfraz, R. A., Ali, S., & Shahid, M. (2014). Antitumour and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys. *Food Chemistry*, 143, 362-366.

Veskoukis, A. S., Vassi, E., Poulas, K., Kokkinakis, M., Asproдини, E., Haroutounian, S., & Kouretas, D. (2020). Grape stem extracts from three native Greek vine varieties exhibit strong antioxidant and antimutagenic properties. *Anticancer Research*, 40(4), 2025-2032.

Stagos, D., Soulitsiotis, N., Tsadila, C., Papaeconomou, S., Arvanitis, C., Ntontos, A., Spandidos, D. A. (2018). Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *International journal of molecular medicine*, 42(2), 726-734.

Suarez RK, Lighton JR, Joos B, Roberts SP, Harrison JF (1996). "Energy metabolism, enzymatic flux capacities, and metabolic flux rates in flying honeybees". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (22): 12616–20

<https://www.globaltrademag.com/the-eu-honey-market-slipped-back-slightly-to-1-4b/>

Von der Ohe W, Persano-Oddo L, Piana ML, Morlot M and Marti P (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35: 18-25

"The Rheological & Mellisopalynological Properties of Honey". *Minerva Scientific* December 2012.

Beekeeping: Everything You Need to Know to Start Your First Beehive by Joachim Petterson -- Weldonowen 2015

Dade AH (1962). *Anatomy and dissection of the honeybee*. Ed; Bee Research Association, England

Alice L. Hopf (1979). *Animals that eat nectar and honey*. Holiday House Incorporated. ISBN 9780823403387.

P. G. Pietta, Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 2000, 63, 1035-1042. Cheeseman KH, Slater TF, "An introduction to free radical biochemistry" : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993

Sies, H. (1985) Introductory Remarks. In: Sies, H., Ed., *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3>

Sies, H. and Jones, D. P. (2007). Oxidative stress. In *Encyclopaedia of Stress* (ed G. Fink), pp. 45-48. San Diego, CA: Elsevier.

Ελληνική Γεωργία (2016). Το εμπόριο μελιού στον κόσμο-οι 10 μεγαλύτερες χώρες παραγωγοί .20. Δεκέμβριος. <https://www.ellinikigeorgia.gr/to-emporio-meliou-ston-kosmo/> [πρόσβαση 26-4-2018]

Halliwell B, Gutteridge JMC (2015). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications, Sixth Edition.

Παπαναγιώτου,Ε. (2010). Οικονομική Ανάλυση τση Μελισσοκομίας στην Ελλάδα. Θεσσαλονίκη: Ιδιωτική Έκδοση

Jean-Prost,P.(2014).Μελισσοκομία.Αθήνα:Εκδόσεις Ψύχαλου , Επιμέλεια έκδοσης: Μπίκος,Θ.

Εμμανουήλ, Ν., Κοντόλαιμος,Ν. και Τατήρης,Β.(2014).Μελισσοκομία ~ Σηροτροφία. Αθήνα: Εκδόσεις ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ

Χαριζάνης, Π.(2014).Μέλισσα και Μελισσοκομική Τέχνη. Αθήνα: Εκδόσεις Βιβλιοσυνεργατική

Wang, J., Li, Q.X. (2011). Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 62, Pages 89-137

Masoura M, Passaretti P, Overton TW, Lund PA, Gkatzionis K. Use of a model to understand the synergies underlying the antibacterial mechanism of H₂O₂-producing honeys. *Sci Rep.* 2020 Oct 19;10(1):17692. doi: 10.1038/s41598-020-74937-6. PMID: 33077785; PMCID: PMC7573686.

Kwakman PH, Zaat SA. Antibacterial components of honey. *IUBMB Life.* 2012 Jan;64(1):48-55. doi: 10.1002/iub.578. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22095907.