

*Bogdan Kędzia, Elżbieta Hołderna-Kędzia

Współczesne poglądy na mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania miodu

Contemporary opinions on the mechanism of antimicrobial action of honey

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań
Dyrektor Instytutu: dr n. ekon. Robert Sobków

SUMMARY

Bee honey is equipped with many mechanisms to protect it against the development of microorganisms, including bacteria, fungi, viruses and protozoa. These properties significantly protect bees from pathogenic microorganisms. This product is used with positive effects for the treatment of infected wounds, ulcers and burns as well as numerous dermatological diseases caused by microorganisms. More over honey is used for preserving food and tissue intended for transplantation. From the literature data it can be concluded that the mechanisms protecting undiluted honey against the development of microorganisms include high osmotic pressure resulting from a high content of sugars, as well as low pH caused by the presence of organic acids. However, after dilution with water or body fluids, this role is mainly performed by hydrogen peroxide generated by the enzymatic reaction (glucose oxidase). In some cases, this mechanism can be supported by a high content of phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids). In variety honey manuka, the antibiotic factor is methylglyoxal, while in the variety honey Revamil – the defensin-1 peptide. The role of lysozyme in honey as an antibiotic substance is unclear and requires further detailed research.

Keywords: bee honey, antimicrobial activity, mechanism of action

STRESZCZENIE

Miód pszczeły wyposażony jest w wiele mechanizmów zabezpieczających go przed rozwojem drobnoustrojów, w tym bakterii, grzybów, wirusów i pierwotniaków. Właściwości te w znacznym stopniu ochraniają pszczoły przed drobnoustrojami chorobotwórczymi. Produkt ten wykorzystuje się z dobrymi efektami do leczenia zakażonych ran, owrzodzeń i oparzeń oraz licznych chorób dermatologicznych wywoływanych przez drobnoustroje. Poza tym miód stosowany jest w celach konserwujących produkty żywnościowe oraz tkanki przeznaczone do przeszczepów. Z przedstawionych danych piśmiennictwa można wnioskować, że do mechanizmów zabezpieczających nierozcieńczony miód przed rozwojem drobnoustrojów należy zaliczyć wysokie ciśnienie osmotyczne, będące wynikiem dużej zawartości cukrów, a także niskie pH spowodowane obecnością kwasów organicznych. Natomiast po rozcieńczeniu wodą lub płynami ustrojowymi rolę tę spełnia głównie nadtlenek wodoru powstający w wyniku reakcji enzymatycznej (oksydaza glukozy). W niektórych przypadkach mechanizm ten może być wspomagany przez wysoką zawartość związków fenolowych (kwasy fenolowe i flawonoidy). W miodzie odmianowym manuka czynnikiem antybiotycznym jest metyloglioksal, a w miodzie odmianowym Revamil – peptyd defenzyna-1. Rola lizozymu w miodzie, jako substancji antybiotycznej, jest niejasna i wymaga dalszych szczegółowych badań.

Słowa kluczowe: miód pszczeły, działanie przeciwdrobnoustrojowe, mechanizm działania

Wprowadzenie

Miód pszczeły wyposażony jest w wiele mechanizmów zabezpieczających go przed rozwojem drobnoustrojów, w tym bakterii, grzybów, wirusów i pierwotniaków. Właściwości te w znacznym stopniu ochraniają pszczoły przed drobnoustrojami chorobotwórczymi (1). Produkt ten wykorzystuje się z dobrymi efektami do leczenia zakażonych ran, owrzodzeń i oparzeń (2) oraz licznych chorób dermatologicznych wywoływanych przez drobnoustroje (3). Poza

tym miód stosowany jest w celach konserwujących produkty żywnościowe (4) oraz tkanki przeznaczone do przeszczepów (5).

Czynniki wpływające na antybiotyczne działanie miodu są dość złożone. Można wyróżnić wśród nich trzy grupy: fizyczne, chemiczne i biologiczne. Do czynników fizycznych należy zaliczyć wysokie ciśnienie osmotyczne, będące wynikiem dużej zawartości cukrów w miodzie, a także niskie pH spowodowane obecnością kwasów organicznych. Czynniki chemiczne

to przede wszystkim nadtlenek wodoru powstający w wyniku reakcji enzymatycznej (oksydaza glukozy), a także występujący w miodzie manuka metyloglioksal oraz w niektórych odmianach miodów - wysoka zawartość związków fenolowych, w tym kwasów fenolowych i związków flawonoidowych. Natomiast do czynników biologicznych zalicza się peptydy - lizozym i defenzynę-1, prawdopodobnie tę samą substancję, tylko różnie nazywaną (6-8).

Czynniki fizyczne

Ciśnienie osmotyczne

Zawartość cukrów w miodach naturalnych, zarówno nektarowych, jak i spadziowych, mieści się w granicach 65-87% (średnio 77%). Średnia zawartość glukozy kształtuje się na poziomie 34%, fruktozy - 39%, sacharozy - 1,6%, a innych cukrów, głównie maltozy i melecytozy, na poziomie 2,4% (9). Wysoka zawartość cukrów w miodzie, a co za tym idzie wysokie ciśnienie osmotyczne, rzędu 500 Pa (10), stwarzają niekorzystne warunki dla rozwoju drobnoustrojów.

Przeżywalność drobnoustrojów w miodzie w warunkach naturalnych jest zróżnicowana (1, 11). Wegetatywne formy chorobotwórczych bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*) oraz bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp.) przeżywają w miodzie od 8 godz. do 3 tyg. Natomiast przetrwalniki laseczek tlenowych (*Bacillus cereus*) i beztlenowych (*Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *C. difficile*) chorobotwórczych dla człowieka mogą przeżywać w miodzie w temp. 25°C przez kilka miesięcy, a w temp. 4°C nawet przez lata. Jednak w tych warunkach nie mogą one kiełkować i przechodzić w formy wegetatywne (12).

Zjawisko to lepiej charakteryzuje tzw. aktywność wodna (a_w) (10). Jest to miernik możliwości wykorzystania wody przez drobnoustroje. Aktywność wodna czystej wody wynosi 1,00, 2% roztworu miodu - 0,99, 12% roztworu miodu - 0,94, 20% roztworu miodu - 0,70, a aktywność wodna nierozcieńczonego miodu zbliżona jest do wartości 0,60 (6). Dla przykładu aktywność wodna 31 miodów hiszpańskich mieściła się w granicach 0,55-0,60 (13).

W tej sytuacji w miodzie nie mają możliwości rozwoju bakterie (a_w w granicach 0,91-0,98), grzyby drożdżoidalne (a_w na poziomie 0,88), grzyby pleśniowe (a_w na poziomie 0,80) oraz pleśnie kserofilne (np. *Aspergillus glaucus*) (a_w na poziomie 0,65) (6, 14, 15). Natomiast w miodzie mogą rozwijać się w sprzyjających warunkach drożdże osmofilne (np. *Saccharomyces rouxii*,

Zygosaccharomyces mellis), dla których aktywność wodna oscyluje w granicach 0,60 (15).

Oznacza to, że w nierozcieńczonym miodzie przeżywanie drobnoustrojów jest bardzo utrudnione. Formy wegetatywne bakterii ulegają w takim środowisku szybkiemu odwodnieniu, wskutek czego giną. Grzyby drożdżoidalne mogą przeżywać w miodzie przez długi czas, ale nie mają szans na rozmnażanie i ich liczba w przechowywanym produkcie maleje. Również przetrwalniki bakteryjne i zarodniki pleśni w środowisku miodu ulegają powolnemu wymieraniu. Tylko drożdże osmofilne, przy zawartości wody powyżej 20%, mogą rozwijać się w tym produkcie (1).

Praktycznie wzrost bakterii, dzięki wysokiej zawartości cukrów, hamowany jest jeszcze w 20% roztworach miodu. Pleśnie kserofilne rosną w 50-60% roztworach miodu, a drożdże osmofilne zdolne są do wzrostu nawet w miodzie zawierającym powyżej 20% wody (6, 10, 14, 15).

Odczyn środowiska (pH)

Dodatkowym czynnikiem uniemożliwiającym rozwój drobnoustrojów w miodzie jest niskie pH tego produktu. Jest ono wynikiem obecności w miodzie wielu kwasów organicznych, zarówno alifatycznych, jak i aromatycznych. Wraz z aminokwasami i kwasami fenolowymi warunkują one wysoką kwasowość miodu.

Według Bogdanova (16) kwasowość ogólna miodów szwajcarskich kształtowała się w granicach 8,9-38,0 mEq/kg (średnio 20,4 mEq/kg). Natomiast Rodriguez i wsp. (17) stwierdzili, że kwasowość ogólna miodów meksykańskich waha się od 13,3 do 46,8 mEq/kg (średnio 30,9 mEq/kg). Z kolei kwasowość ogólna miodów polskich wynosi od 17,7 do 48,5 mEq/kg (średnio 34,0 mEq/kg) (18).

Do ważniejszych kwasów alifatycznych występujących w miodzie zalicza się kwasy: glukonowy, bursztynowy i cytrynowy, a z kwasów aromatycznych kwasy: benzoesowy, cynamonowy i absycynowy. Z wolnych aminokwasów w największej ilości w miodzie występują prolina i fenyloalanina. Wśród najczęściej spotykanych kwasów fenolowych wymienia się kwasy: chlorogenowy, kawowy i ferulowy (9).

Bogdanov (16) podaje, że pH miodów szwajcarskich mieści się w granicach 3,4-5,4 (średnio 4,1). Dla miodów hiszpańskich (13) wartości te zawierają się w granicach pH od 3,7 do 4,1 (średnio 4,0), dla miodów meksykańskich (17) w granicach od 3,5 do 5,0 (średnio 3,8), a dla miodów krajowych (18) w granicach od 4,0 do 4,3 (średnio 4,2).

W świetle powyższych danych należy zaznaczyć, że najmniejsze pH, przy którym rośnie jeszcze większość

bakterii chorobotwórczych, takich jak ziarniaki Gram-dodatnie – *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, oraz pałeczki Gram-ujemne – *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, mieści się w przedziale 4,5-5,7 (10). Minimalne pH dla bakterii uczestniczących w rozkładzie żywności kształtuje się z kolei w granicach 4,2-4,5. To sprawia, że większość bakterii nie ma szans na rozmnażanie się, a nawet na przeżycie w takim produkcie jak naturalny miód pszczele (1).

Czynniki chemiczne

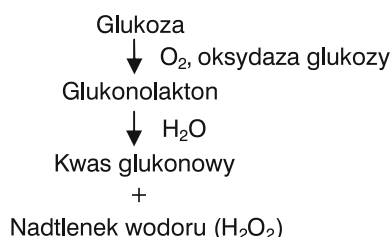
Nadtlenek wodoru

Wysokie stężenie cukrów i kwaśny odczyn środowiska w pełni uzasadniają tylko przeciwdrobnoustrojową aktywność naturalnego nierozcieńczonego miodu.

W 1966 roku White (19) zauważył, że po rozcieńczeniu miodu wodą można uzyskać znacznie wyższą jego aktywność wobec badanych drobnoustrojów niż tę, która wynika z wysokiego stężenia cukrów. W trakcie prowadzonych badań wykrył on enzym – oksydazę glukozy, który sam nie wykazywał właściwości przeciwdrobnoustrojowych, natomiast katalizował utlenianie glukozy do laktonu kwasu glukonowego (glukonolaktonu) w obecności tlenu atmosferycznego. Okazało się, że lakton ten po przyłączeniu cząsteczki wody przechodzi następnie w kwas glukonowy. W reakcji tej jako produkt uboczny powstaje nadtlenek wodoru (H_2O_2) (ryc. 1) – związek o silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Nadtlenek wodoru działa zarówno na bakterie i grzyby, jak również na wirusy oraz pierwotniaki. Już w stężeniu 3-10 $\mu\text{g/ml}$ (przy pH 5,0) działa bakteriostatycznie wobec chorobotwórczych Gram-dodatnich ziarniaków *Staphylococcus aureus*, Gram-ujemnych pałeczek *Pseudomonas aeruginosa*, grzybów drożdżoidalnych *Candida albicans* oraz grzybów pleśniowych *Aspergillus fumigatus* (20, 21).

Następnie Dustman (22) stwierdził, że w miodzie nierozcieńczonym opisana powyżej reakcja zachodzi bardzo wolno. Natomiast po rozcieńczeniu miodu



Ryc. 1. Mechanizm powstawania nadtlenku wodoru z glukozy (wg 19)

wodą wytwarzanie nadtlenku wodoru zachodzi bardzo szybko. Jeśli na przykład w 1 g nierozcieńczonego miodu ilość wytwarzanego nadtlenku wodoru wynosi 3 $\mu\text{g/godz.}$, to po rozcieńczeniu go wodą ilość ta wzrasta w granicach 17-662 $\mu\text{g/godz.}$ A zatem aktywność antybiotyczna rozcieńczonego miodu może wzrastać od 6 do 220 razy w porównaniu z miodem nierozcieńczonym.

Dustman (22) wykazał ponadto, że występuje duże zróżnicowanie miodów w zależności od zdolności wytwarzania nadtlenku wodoru. I tak do miodów wytwarzających niewielkie ilości H_2O_2 można zaliczyć miód akacjowy, wrzosowy i rzepakowy, natomiast do miodów o dużej zawartości tego związku należą: miód kasztanowy i miód ze spadzi iglastej (tab. 1).

Oksydaza glukozy jest enzymem wrażliwym na ciepło. Miód ogrzewany przez 15 min w temp. 60°C, 5 min w temp. 80°C lub wystawiany na godzinę na słońce może całkowicie utracić swoje właściwości antybiotyczne (23). Ponadto nadtlenek wodoru obecny w miodzie i jego roztworach może ulegać rozkładowi na wodę i tlen pod wpływem enzymu katalazy. Występuje ona niekiedy w miodach nektarowych i pochodzi z pyłku kwiatowego. Miody zawierające katalazę odznaczają się niską aktywnością antybiotyczną lub są jej pozbawione całkowicie (19, 23).

Z danych przedstawionych przez Allena i wsp. (24) wynika, że aktywność miodu rozcieńczonego wodą zależy głównie od obecności w nim nadtlenku wodoru. Na 180 próbek rozcieńczonego miodu, do którego wprowadzono enzym katalazę, tylko 11 z nich (6,1%) nadal odznaczało się aktywnością antybiotyczną. W pozostałych przypadkach aktywność ta uległa całkowitemu unieczynnieniu. Świadczy to niezbicie o antybiotycznym działaniu nadtlenku wodoru, wytworzonym pod wpływem oksydazy glukozy. Natomiast w przypadku rozcieńczonych próbek miodu, wykazujących aktywność antybiotyczną, mimo dodania katalazy, prawdopodobnie zadziałały

Tab. 1. Ilość wytwarzanego nadtlenku wodoru w miodach odmianowych po rozcieńczeniu ich wodą (wg 22)

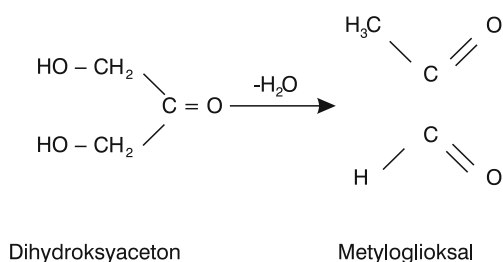
Odmiana miodu	Liczba badanych prób	Ilość wytworzonego nadtlenku wodoru ($\mu\text{g/g}$)
akacjowy	3	18-32
wrzosowy	3	29-34
rzepakowy	4	42-125
kasztanowy	5	120-605
ze spadzi iglastej	5	284-663

inne mechanizmy obrony przeciwdrobnoustrojowej, takie jak metyloglioksal, związki fenolowe lub peptyd defenzyna-1.

Metyloglioksal

Badania ostatniego dziesięciolecia dotyczące wysokiej aktywności antybiotycznej miodu manuka wykazały, że za tę właściwość odpowiedzialny jest metyloglioksal – związek powstający w wyniku przemian chemicznych zachodzących w nektarze nowozelandzkiej rośliny *Leptospermum scoparium*. Według Adamsa i wsp. (25) metyloglioksal powstaje z dihydroksyacetonu, w wyniku reakcji odwodnienia tego związku (ryc. 2).

Mavric i wsp. (26) stwierdzili, że zawartość metyloglioksalu w 6 próbkach miodu manuka wynosiła od 38 do 761 mg/kg. Adams i wsp. (25) w 49 próbkach miodu manuka określili zawartość metyloglioksalu na poziomie od 38 do 709 mg/kg. Z kolei Atrott i Henle (27) podają, że zawartość tego związku w 61 próbkach miodu manuka mieściła się w przedziale od 189 do 835 mg/kg. Biorąc pod uwagę wymienione badania, można przyjąć wartość 410 mg/kg



Ryc. 2. Tworzenie się metyloglioksalu w miodzie manuka na drodze reakcji odwodnienia dihydroksyacetonu (wg 25)

metyloglioksalu jako wartość przeciętną tego związku w miodzie manuka.

Warto dodać, że we wszystkich innych odmianach miodu zawartość metyloglioksalu jest bardzo niska i kształtuje się na poziomie 1,6-24,0 mg/kg (średnio 4,9 mg/kg), a zatem jest ponad 80 razy niższa niż w miodzie manuka (25, 26).

Według Kwakmana i wsp. (28) w miodzie manuka występuje także oksydaza glukozy, w wyniku działania której w środowisku wodnym wytwarza się nadtlenek wodoru. Poza tym są w nim obecne związki polifenolowe, które odznaczają się aktywnością antybiotyczną. Jednak w miodzie tym odgrywają one rolę drugorzędą. Wysoka aktywność antybiotyczna miodu manuka zależna jest głównie od obecności w nim metyloglioksalu.

Aktywność antybiotyczną miodu manuka i jego działanie na drobnoustroje chorobotwórcze dla człowieka przedstawiono w tabeli 2. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że miód manuka hamował rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka w granicach stężeń 2,0-68,5%. Bakterie Gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus*) oraz Gram-ujemne (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Helicobacter pylori* i in.) oraz beztlenowe laseczki *Clostridium difficile* odznaczały się dużą wrażliwością na miód manuka. Stężenia hamujące rozwój tych drobnoustrojów mieściły się w granicach MIC = 2,0-13,7%. Na grzyby drożdżoidalne z rodzaju *Candida* miód manuka działał ze średnią aktywnością antybiotyczną (MIC = 33,4-42,6%). Natomiast na niektóre dermatofity produkt ten działał słabo (MIC = 13,7-68,5%).

Przedstawione powyżej wyniki badań wskazują, że miód manuka dzięki obecności w nim metyloglioksalu

Tab. 2. Działanie miodu manuka na drobnoustroje chorobotwórcze dla człowieka

Pozycja piśmiennictwa	Drobnoustroje i ich pochodzenie	Liczba szczepów	MIC (%)
Allen i wsp. (29)	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA i VRE	142	4,1-13,7
Brady i Molan (30)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>	17	2,0-11,0
Cooper i wsp. (31)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	5,5-12,3
Cooper i wsp. (32)	<i>Burkholderia cepacia</i>	20	2,9-6,9
Somal i wsp. (33)	<i>Helicobacter pylori</i>	7	6,9
Hammond i Donhor (34)	<i>Clostridium difficile</i>	3	8,6
Irish i wsp. (35)	<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. dubliniensis</i>	38	33,4-42,6
Brady i wsp. (36)	<i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichophyton</i> sp., <i>Microsporum</i> sp.	7	13,7-68,5

odznacza się wobec większości drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka wysoką aktywnością antybiotyczną, co ma duże znaczenie z medycznego punktu widzenia.

Należy jednak zwrócić uwagę na to, że nie wszystkie serie miodu manuka nadają się do celów leczniczych. Do tego służą tylko te serie miodu, które zawierają co najmniej 400 mg metyloglioksalu w 1 kg tego produktu. Miody takie oznacza się symbolem MGO 400+. W leczeniu do niszczenia drobnoustrojów wewnątrz i na zewnątrz organizmu stosuje się także miód manuka oznaczony symbolem MGO 550+. Miód taki zawiera minimum 500 mg metyloglioksalu w 1 kg produktu (37).

Jeszcze inną kwestią wartą podkreślenia jest to, że metyloglioksal obecny w miodzie manuka jest niewrażliwy na podwyższoną temperaturę. Co więcej, w miodzie eksponowanym na słońcu, przechowywanym przez dłuższy czas w ciepłych pomieszczeniach lub ogrzewanym (np. przez 3 godz. w temp. 80°C), poziom metyloglioksalu znacznie wzrasta. W tych warunkach wzrasta jednak także zawartość 5-hydroksymetylofurfuralu (5-HMF), co w wielu przypadkach może być nawet powodem jego dyskwalifikacji (38).

Związki fenolowe

Do substancji przeciwdrobnoustrojowych miodu należy zaliczyć również termostabilne związki fenolowe, takie jak kwasy fenolowe i flawonoidy.

Dane przedstawione w tabeli 3 wskazują, że zawartość kwasów fenolowych w miodach odmianowych może kształtować się bardzo różnie. W niektórych miodach ich zawartość jest śladowa (średnio 3,7 $\mu\text{g/g}$), w innych niska (średnio 15,4 i 60,7 $\mu\text{g/g}$), umiarkowana (średnio 218,5 $\mu\text{g/g}$), wysoka (średnio 578,6 $\mu\text{g/g}$), a jeszcze w innych zawartość kwasów fenolowych jest bardzo wysoka (średnio 2123,3 $\mu\text{g/g}$).

Tab. 3. Zawartość kwasów fenolowych w miodach odmianowych

Pozycja piśmiennictwa	Liczba badanych odmian miodu	Średnia zawartość kwasów fenolowych ($\mu\text{g/g}$) ¹
Martos i wsp. (39)	3	3,7
Kołoczek i wsp. (40)	6	15,4
Schneider i wsp. (41)	2	60,7
Rodriguez i wsp. (42)	14	218,5
Kishore i wsp. (43)	4	578,6
Andrade i wsp. (44)	2	2123,3

¹W przeliczeniu na kwas galusowy

W miodach najczęściej wykrywano kwasy: galusowy, kawowy, ferulowy, p-kumarowy, p-hydroksybenzoesowy, syringowy, chlorogenowy, elagowy i wanilinowy (39, 40, 44-46).

Jeśli weźmiemy pod uwagę aktywność antybiotyczną kwasów fenolowych, to z badań własnych wynika, że hamują one wzrost wzorcowego szczepu gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P) w stężeniach od 250 do 5000 $\mu\text{g/ml}$ (47). Przy uwzględnieniu rozcieńczenia miodu można przyjąć, że tylko niektóre z nich mają szansę bezpośredniego hamowania rozwoju tego drobnoustroju i innych drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka.

Podobna sytuacja zarysowuje się w przypadku flawonoidów. Ich obecność w miodach jest również zróżnicowana. Z tabeli 4 wynika, że w miodach odmianowych może występować niewielka zawartość flawonoidów (w granicach 5,2-9,4 $\mu\text{g/g}$) lub większa ich ilość (średnio 395,0 $\mu\text{g/g}$) (43, 48, 49). W miodach polskich występują zwykle: kemferol, apigenina, izoramnetyna, 8-metoksykemferol, kwercetyna i luteolina (50). Ich aktywność antybiotyczna wobec szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* 6538 P mieści się w granicach 50-1000 $\mu\text{g/ml}$ (50). Stąd można wnioskować, że w większości przypadków stężenie flawonoidów zawartych w miodzie jest zbyt małe, aby zahamować wzrost drobnoustrojów, szczególnie gdy miód jest rozcieńczony wodą lub płynami ustrojowymi.

A zatem w podsumowaniu można przyjąć, że obecne w miodzie związki fenolowe, takie jak kwasy fenolowe i flawonoidy, mogą pełnić rolę ochronną przed rozwojem drobnoustrojów. Z danych piśmiennictwa wynika jednak, że nie są to sytuacje zbyt częste.

Czynniki biologiczne

Wprowadzenie

W 1968 roku Mohrig i Messner (51) donieśli, że w miodzie pszczelim występuje lizozym

Tab. 4. Zawartość flawonoidów w miodach odmianowych

Pozycja piśmiennictwa	Liczba badanych odmian miodu	Średnia zawartość flawonoidów ($\mu\text{g/g}$) ¹
Kassim i wsp. (48)	2	5,2
Hołderna-Kędzia i wsp. (49)	4	9,4
Kishore i wsp. (43)	4	395,0

¹W przeliczeniu na kwercetynę

– peptyd o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Substancja ta charakteryzowała się łączyściami komórkowych ziarniaków Gram-dodatnich. Działała także na komórki bakterii Gram-ujemnych. Występowanie tego peptydu w miodzie potwierdzili Nagornaja i Lewczenko (52). Ustalili oni, że przedostaje się on do miodu i innych produktów pszczelich z gruczołów gardzielowych pszczół.

Badania nad występowaniem lizozymu w miodzie kontynuowali następnie Bodnarczuk i wsp. (53-55), jednak w żadnej z publikacji nie podają oni bliższej charakterystyki tej substancji. A zatem nie wiemy, czy peptyd ten (autorzy nazywają go enzymem) był rzeczywiście lizozymem, czy innym peptydem lub grupą peptydów występujących w wydzielinie gruczołów gardzielowych pszczół, czyli w mleczku pszczelim.

Lizozym jest peptydem złożonym ze 129 aminokwasów o masie cząsteczkowej 14,4 kDa (56). Według Fujiwary i wsp. (57) w mleczku pszczelim występuje peptyd rojalizyna zbudowany z 51 aminokwasów o m.c. ok. 5,5 kDa. Bilikova i wsp. (58) wykryli następnie w mleczku pszczelim peptyd apisiminę, złożony z 54 aminokwasów, także o m.c. ok. 5,5 kDa. Z kolei Fontana i wsp. (59) z omawianego produktu wyizolowali 4 peptydy, które nazwano jelleninami. Składały się one z 8-10 aminokwasów i miały m.c. w granicach 0,9-1,1 kDa.

Należy dodać, że wszystkie wymienione peptydy odznaczały się działaniem przeciwdrobnoustrojowym. Hamowały one wzrost bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów drożdżoidalnych.

Najnowsze badania Kwakmana i wsp. (60) wskazują, że występujący w mleczku pszczelim peptyd defenzyna-1 o m.c. ok. 5 kDa jest wcześniej zidentyfikowanym peptydem - rojalizyną.

W tym kontekście powstaje pytanie, czy wspomniany wcześniej lizozym nie jest defenzyną-1 (rojalizyną) lub zespołem wszystkich peptydów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym znajdujących się w wydzielinie gruczołów gardzielowych pszczół.

Dla uporządkowania danych na temat antybiotycznego działania lizozymu i defenzyny-1 substancje te zostaną omówione osobno.

Lizozym

Lizozym jest substancją, która zachowuje aktywność biologiczną w szerokim zakresie pH, a więc również w środowisku kwaśnym. W tych warunkach jest on termostabilny i może być ogrzewany nawet do 100°C (56). Natomiast jest wrażliwy na działanie światła (51).

Działanie lizozymu na bakterie Gram-dodatnie jest silniejsze, ponieważ powoduje on łączyściami

komórkowych tych bakterii złożonych z glikozaminoglikanów, których głównym składnikiem jest kwas N-acetylmuraminowy. Wobec bakterii Gram-ujemnych działanie lizozymu jest słabsze (51-53). Szczególnie istotne jest hamowanie przez lizozym bakterii chorobotwórczych dla człowieka, takich jak: *Salmonella* sp., *Brucella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* i *Listeria monocytogenes* oraz proteolitycznych szczepów *Clostridium botulinum* (56).

Bodnarczuk i wsp. (53) wykazali, że zawartość lizozymu w różnych miodach odmianowych mieści się w granicach 1,5-15,4 µg/g (tab. 5). Autorzy wykazali, że pochodzenie miodu i czas przechowywania nie miały zasadniczego wpływu na jego poziom. Do istotnych czynników decydujących o stopniu wzbogacenia miodu w powyższy związek zaliczono natomiast: intensywność wydzielania nektaru, dostępność nektaru dla pszczół, siłę rodziny pszczelej, a także stopień rozwoju gruczołów gardzielowych.

Przedstawione w tabeli 5 wyniki badań nie dają jednak odpowiedzi na pytanie, czy wymienione ilości tego peptydu obecne w miodach zdolne są do zahamowania rozwoju drobnoustrojów. Należy przy tym również wziąć pod uwagę i to, że zazwyczaj w praktyce stosuje się miody rozcieńczone wodą lub miody ulegające rozcieńczeniu pod wpływem płynów ustrojowych, a to znacznie obniża poziom zawartego w nich lizozymu.

Tab. 5. Zawartość lizozymu w miodach odmianowych (wg 53)

Numer próby miodu	Odmiana miodu	Zawartość lizozymu (µg/g)
1	lipowy	5,0
2	lipowy	2,6
3	akacyjny	3,5
4	akacyjny	15,4
5	akacyjny	3,0
6	akacyjny	6,3
7	akacyjny	4,7
8	akacyjny	1,5
9	gryczany	4,0
10	chabrowy	15,3
11	wielokwiatowy	9,8
12	wielokwiatowy	7,4
13	spadziowy	1,7

Defenzyna-1

Kwakman i wsp. (61, 62) badając bakteriobójcze właściwości miodu o nazwie Revamil, stwierdzili, że po jego rozcieńczeniu obok nadtlenu wodoru występuje jeszcze jeden składnik o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Miód ten pozyskuje się w jednej z holenderskich firm pszczelarskich w odizolowanych szklarniach. Jest on przeznaczony do celów leczniczych, a jego produkcja objęta jest całkowitą ochroną informacyjną.

Po dogłębnych badaniach (60, 62) wykryto, że czynnikiem tym jest peptyd defenzyna-1, który wraz z mleczkiem pszczelim, wytwarzanym w gruczołach gardzielowych pszczół, przedostaje się w stosunkowo dużych ilościach do miodu. W ten sposób po raz pierwszy udowodniono, że peptyd ten, o masie cząsteczkowej ok. 5 kDa, może występować w miodzie jako substancja o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Późniejsze badania (63) wykazały, że obecna w 20% roztworze miodu Revamil defenzyna-1 (po zneutralizowaniu nadtlenu wodoru) jest w stanie w ciągu 24 godz. całkowicie zniszczyć komórki, w liczbie 10^6 - 10^7 /ml, następujących bakterii chorobotwórczych: metycylinoopornego ziarniaka *Staphylococcus aureus*, wankomycynoopornego ziarniaka *Enterococcus faecalis*, β -laktamazowej pałeczki *Escherichia coli*,

β -laktamazowej pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* oraz odpornej na antybiotyki pałeczki *Burkholderia cepacia*. Bakterie te stanowią poważny problem w leczeniu szpitalnym (trudno gojące się rany zakażone drobnoustrojami opornymi na antybiotyki).

Podsumowanie

Z przedstawionych danych piśmiennictwa można wnioskować, że do mechanizmów zabezpieczających nierozcieńczony miód przed rozwojem drobnoustrojów należy zaliczyć wysokie ciśnienie osmotyczne, będące wynikiem dużej zawartości cukrów, a także niskie pH spowodowane obecnością kwasów organicznych.

Natomiast po rozcieńczeniu miodu wodą lub płynami ustrojowymi rolę tę spełnia głównie nadtlenek wodoru powstający w wyniku reakcji enzymatycznej (oksydaza glukozy). W niektórych przypadkach mechanizm ten może być wspomagany przez wysoką zawartość związków fenolowych (kwasy fenolowe i flawonoidy).

W miodzie odmianowym manuka czynnikiem antybiotycznym jest metyloglioksal, a w miodzie odmianowym Revamil peptyd defenzyna-1.

Natomiast rola lizozymu w miodzie, jako substancji antybiotycznej, jest niejasna i wymaga dalszych szczegółowych badań.

Piśmiennictwo

1. Snowdown JA, Clivier DO. Microorganisms in honey. Int J Food Microbiol 1996; 31:1-26.
2. Al-Waili NS, Salom K, Al-Ghamdi AA. Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. Sci World J 2011; 11:766-87.
3. Burlando B, Cornara L. Honey in dermatology and skin care: a review. J Cosmet Dermatol 2013; 12(4):306-13.
4. Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. Arch Med Res 2005; 36:464-7.
5. Gupta M. Preservation of split skin grafts in honey: a preliminary study. Indian J Surg 1977; 11:591-8.
6. Molan PG. The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. Bee World 1992; 73(2):59-76.
7. Al-Waili NS, Salom K, Butler G i wsp. Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. J Med Food 2011; 14(10):1079-96.
8. Kwakman PHS, Zaat SAJ. Antibacterial components of honey. Life 2012; 64(1):48-55.
9. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Miód. Skład i właściwości biologiczne. Pręds Wyd Rzeczpospolita SA, Warszawa 2008; 51-64.
10. Horubała A. Podstawy przechowywania żywności. PWN, Warszawa 1975; 26-38, 72-5.
11. Tysset C, Durand C. On the survival of some Gram-negative, non-sporulated bacteria in commercial honey. Bull Acad Vet Fr 1973; 46:191-6.
12. Kukubo Y, Jinbo K, Kaneko S i wsp. Prevalance of spore-forming bacteria in commercial honey. Ann Rep Tokyo Metr Res Lab Health 1984; 35:192-6.
13. Gallardo-Chancón JJ, Caselles M, Izquierdo-Pulido M i wsp. Inhibitory activity of monofloral and multifloral honeys against bacterial pathogens. J Apicult Res Bee World 2008; 47(2):131-6.
14. Müller G. Podstawy mikrobiologii żywności. PWN, Warszawa 1983; 113-7.
15. Rhodes MF (ed.). Food mycology. Hall and Co, Boston 1979; 159-63.
16. Bogdanov S. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. Lebens Wiss Technol 1997; 30:748-53.
17. Rodríguez B, Mendoza S, Iturriga MH i wsp. Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. J Food Sci 2012; 77(1):C121-7.
18. Rybak-Chmielewska H, Szczęsna T. Charakterystyka krajowych miodów odmianowych. [W:] Rybak-Chmielewska H (red.). Podstawowe zagadnienia jakości miodu. Wyd Inst Sadown Kwiac Oddz Pszczeln, Puławy 1996; 16-22.
19. White JW. Inhibine and glucose oxidase in honey – a review. Am Bee J 1966; 106:214-6.
20. Zander E, Koch A. Der Honig. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 1975; 94-6.
21. Kramer A, Hetmanek R, Weuffen W i wsp. Wasserstoffperoxide. [In:] Handbuch der Antiseptik, Band II. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1987; 447-91.
22. Dustman JH. Messung von Wasserstoffperoxid und Enzymaktivität in mitteleuropäischen Honigen. Z Bienenforsch 1967; 9:66-73.
23. Gonnat M. Naturalnyje antibiotičeskiye faktory, sodierzaszcziesja w miedie. [In:] Produkty pčelowodstwa – pischcza, zdorowie, krasota. Izd. Apimondii, Bucharest 1988; 33-7.

24. Allen KL, Molan PC, Reid GM. The variability of the antibacterial activity of honey. *Apiacta* 1991; 4:114-21.
25. Adams CJ, Boulton CH, Deadman BJ i wsp. Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 2008; 343:651-9.
26. Mavric E, Wittman S, Barth G i wsp. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:483-9.
27. Atrott J, Henle T. Methylglyoxal in manuka honey – correlation with antibacterial properties. *Czech J Food Sci* 2009; 27:5163-5.
28. Kwakman PHS, Velde AA, Boer L i wsp. How honey kills bacteria. *FASEB J* 2010; 24:2576-82.
29. Allen KL, Hutchinson G, Molan PC. The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. First World Wound Healing Congress, 10-13 September 2000, Melbourne (Australia). Handbook and Abstracts: 86.
30. Brady NF, Molan PC. Antibacterial activity of honey against enteropathogenic bacteria. *Univ Waikato, Hamilton* 1997; 1-17.
31. Cooper RA, Halas E, Molan PC. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burn Care Rehabil* 2002; 23:366-70.
32. Cooper RA, Wigley P, Burton NF. Susceptibility of multiresistant strains of *Burkholderia cepacia* to honey. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31:20-4.
33. Somal NA, Coley KE, Molan PC i wsp. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *JR Soc Med* 1994; 87:9-12.
34. Hammond EN, Donhor ES. Antibacterial effect of manuka honey on *Clostridium difficile*. *BMC Res Not* 2013; 6:188-92.
35. Irish J, Carter DA, Shokohi T i wsp. Honey has antifungal effect against *Candida* species. *Med Mycol* 2006; 44:289-91.
36. Brady ANF, Molan PC, Harfoot CG. The sensitivity of dermatophytes to the antimicrobial activity of manuka honey and other honey. *Pharm Sci* 1996; 2:471-3.
37. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Aktywność antybiotyczna miodu manuka i jego działanie na drobnoustroje chorobotwórcze dla człowieka. *Post Fitoter* 2015; 16(4):258-62.
38. Stephens JM, Schlothauer RC, Morris BD i wsp. Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and hanuka honeys. *Food Chem* 2010; 120:78-86.
39. Martos I, Cossentini M, Ferveres F i wsp. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J Agric Food Chem* 1997; 45:2854-9.
40. Kołoczek H, Kaszycki P, Świdorski A i wsp. Wsparcie produkcji i zbytu miodu – ocena zawartości antyutleniaczy w miodach polskich. Projekt badawczy. Apipol-Farma, Myślenice 2005.
41. Schneider M, Coyle S, Warnock M i wsp. Anti-microbial activity and composition of Manuka and Portobello honey. *Phytother Res* 2013; 27:1162-8.
42. Rodriguez BA, Mendoza S, Iturriga M i wsp. Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. *J Food Sci* 2012; 77(1):C121-7.
43. Kishore RK, Halim AS, Syazana MSN i wsp. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. *Nutr Res* 2011; 31:322-5.
44. Andrade P, Ferveres F, Amaral MT. Analysis of honey phenolic acids by HPLC its application to honey botanical characterization. *J Liq Chrom Rel Technol* 1997; 20:2281-8.
45. Tomàs-Barberán FA, Martos I, Ferveres F i wsp. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J Sci Food Agric* 2001; 81:485-96.
46. Dimitrova B, Gerrenova R, Anklam E. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Photochem Anal* 2007; 18:24-32.
47. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Działanie przeciwdrobnoustrojowe roślinnych pochodnych fenolu. *Post Fitoter* 2012; (3):151-5.
48. Kassim M, Achoni M, Mustafa MR i wsp. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate *in vitro* anti-inflammatory activity. *Nutr Res* 2010; 30:650-9.
49. Hołderna-Kędzia E, Mścisz A, Kędzia B. Badania nad aktywnością antybiotyczną i zawartością flawonoidów w miodach odmianowych. *Mat XL Nauk Konf Pszczel Puławy* 2003; 127.
50. Hołderna-Kędzia E, Kędzia B. Antybiotyczne działanie miodu. *IX Kraj Nauk-Tech Konf Pszczel, Częstochowa* 2003; 83-95.
51. Mohrig W, Messner B. Lysozym als antibakterielles Agens im Bienenhonig und Bienengift. *Acta Biol Med Germ* 1968; 21:85-90.
52. Nagornaja IM, Lewczenko IA. Lizozim – baktericydnyj component pczelinogo mieda. *Apiterapia i pczelowodstwo. Wyd Alna Litera, Wilnjus* 1993; 4-9.
53. Bodnarczuk LI, Nagornaja IM, Lewczenko IA. Nowoje ob antibakterialnych swojstwach mieda. *Pczelowodstwo* 1995; (4):48-9.
54. Bodnarczuk L, Nagornaya I, Levchenko I. Factors that determine lysozyme level in the honey. *Mat XL Nauk Konf Pszczel, Puławy* 2003; 110-1.
55. Bodnarczuk LI, Nagornaya IM, Levchenko IA i wsp. Wpływ pokarmu białkowego na ilość lizozymu w gruczołach potylicznych pszczoł. *Przełg Pszczel* 2006; (3):34-5.
56. Trziszka T, Kopec W. Lizozym i jego charakterystyka. Właściwości biologiczne i fizykochemiczne. *Przem Spoż* 1997; 51(1):41-3.
57. Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M i wsp. A potent antibacterial protein in royal jelly. *J Biol Chem* 1990; 265:11333-7.
58. Bilikova K, Hanes J, Nordhoff E i wsp. Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Lett* 2002; 528:125-9.
59. Fontana R, Meudes MA, Monson de Souza B i wsp. Jelleins: a family of antibacterial peptides from royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* 2004; 25:919-28.
60. Kwakman PHS, Velde AA, Boer L i wsp. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLOS ONE* 2011; 6(3):e17709.
61. Kwakman PHS, Van der Akker JPC, Güglü A i wsp. Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria *in vitro* and eradicates skin colonization. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1677-82.
62. Kwakman PHS, Velde AA, Boer L i wsp. How honey kills bacteria. *FASEB J* 2010; 24:2576-82.
63. Kwakman PHS, Boer L, Ruyter-Spira CP i wsp. Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30:251-7.

Konflikt interesów**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 17.09.2017

zaakceptowano/accepted: 30.10.2017

Adres/address:

*prof. dr hab. n. farm. Bogdan Kędzia
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
ul. Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznań
tel.: +48 (61) 84-55-867
e-mail: bogdan.kedzia@iwnirz.pl