ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2512
https://elibrary.ru/GBYSJN

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Изменение химического состава и антимикробной активности меда, хранящегося при низких температурах

Д. В. Грузнов[1,*], О. А. Грузнова[2], А. Б. Сохликов[1], А. В. Лобанов[2,3]

[1] *Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Москва, Россия*

[2] *Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия*

[3] *Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия*

Поступила в редакцию: 22.11.2023
Принята после рецензирования: 20.12.2023
Принята к публикации: 09.01.2024

**Д. В. Грузнов: 79164422245@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6679-9466*
О. А. Грузнова https://orcid.org/0000-0002-0241-1482
А. Б. Сохликов: https://orcid.org/0000-0001-6402-4624
А. В. Лобанов: https://orcid.org/0000-0003-4205-7630

© Д. В. Грузнов, О. А. Грузнова, А. Б. Сохликов, А. В. Лобанов, 2024

Аннотация.
В процессе хранения натуральный мед может менять свои физико-химические и биологические свойства. Согласно требованиям ГОСТ 19792-2017 мед следует хранить при температуре не выше 20 °C. Существуют литературные данные о длительном хранении меда при низких температурах, что обеспечивает стабильность его некоторых физико-химических показателей. Несмотря на перспективность практического использования низких температур, необходимо учитывать их возможное негативное влияние на химический состав меда. Цель исследования – изучение влияния различных температурных условий хранения меда разного ботанического происхождения на его физико-химические и биологические показатели.
Объектами исследования были образцы свежеоткачанного липового, гречишного и подсолнечникового меда из Ростовской, Волгоградской, Курской, Воронежской и Саратовской областей, а также Краснодарского края. Образцы хранились в климатических испытательных камерах М-60/100-500 КТВХ в течение 12 месяцев. Для определения физико-химических и биологических показателей применялись общепризнанные, стандартные и авторские методики.
В результате исследований обнаружили, что гидроксиметилфурфураль стабилен при –18 °C в течение 12 месяцев; при 18 °C на 12-м месяце наблюдалось его резкое увеличение на 472,5–488,1 %. Выявили снижение активности ферментов диастазы, D-глюкозо-1-оксидазы и каталазы при всех температурных режимах уже на 1-м месяце хранения. Минимальные изменения наблюдались при 0 и 5 °C. В данном температурном диапазоне был стабилен пероксид водорода (H_2O_2): на 12-м месяце хранения его концентрация снизилась не более чем на 12,2 %. Влажность, массовая доля редуцирующих сахаров и кислотность всех образцов значительно не изменились. Проведенный антимикробный тест с использованием культур *Escherichia coli* (штамм 1257), *Staphylococcus aureus* (штамм 209-P) и *Bacillus cereus* (штамм 96) показал, что наибольшим ингибирующим действием обладали образцы липового и гречишного меда, хранившиеся при 5 и 0 °C в течение 12 месяцев.
Оптимальные температуры для хранения меда в течение длительного времени находятся в пределах от 5 до 0 °C. Полученные результаты могут быть использованы в качестве дополнительных рекомендаций при внесении изменений в нормативную документацию, регулирующую требования к хранению меда.

Ключевые слова. Мед, температура хранения, гидроксиметилфурфураль, сахара, кислоты, ферменты, пероксид водорода, микроорганизмы

Финансирование. Работа выполнена по научной теме молодежной лаборатории переработки природного сырья в рамках реализации программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» (проект № 122122600056-9).

Для цитирования: Изменение химического состава и антимикробной активности меда, хранящегося при низких температурах / Д. В. Грузнов [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 2. С. 330–341. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2512

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2512
https://elibrary.ru/GBYSJN

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Effect of Low-Temperature Storage on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Honey

Dmitry V. Gruznov[1,*], Olga A. Gruznova[2], Alexey B. Sokhlikov[3], Anton V. Lobanov[2,3]

[1] *All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology, Moscow, Russia*

[2] *Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

[3] *Moscow Pedagogical State University, Moscow, Russia*

Received: 22.11.2023
Revised: 20.12.2023
Accepted: 09.01.2024

**Dmitry V. Gruznov: 79164422245@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6679-9466*
Olga A. Gruznova: https://orcid.org/0000-0002-0241-1482
Alexey B. Sokhlikov: https://orcid.org/0000-0001-6402-4624
Anton V. Lobanov: https://orcid.org/0000-0003-4205-7630

© D.V. Gruznov, O.A. Gruznova, A.B. Sokhlikov, A.V. Lobanov, 2024

Abstract.
Natural honey can change its physicochemical and biological properties during storage. According to State Standard 19792-2017, honey should be stored at ≤ 20°C. Some publications promote long-term storage of honey at temperatures between 0 and –20°C that preserves its physicochemical parameters, especially the content of hydroxymethylfurfural. Promising as they seem, such temperature modes may affect other physicochemical parameters of honey. The research objective was to study the effect of different temperature conditions on various honey samples and their physicochemical and biological parameters during long-term storage.
The study applied standard and authentic research methods to fresh linden, buckwheat, and sunflower honey samples obtained from Rostov, Volgograd, Kursk, Voronezh, Saratov, and Krasnodar regions. They were stored in heat, cold, and moisture test chambers M-60/100-500 for 12 months.
Hydroxymethylfurfural proved stable at –18°C for 12 months. After 12 months at 18°C, it showed a sharp increase of 472.5–488.1%. The activity of enzymic diastase, D-glucose-1-oxidase, and catalase occurred at all temperature modes after 1 month of storage. At 0–5°C, the changes were minimal: hydrogen peroxide (H_2O_2) remained stable, and its concentration decreased by ≤ 12.2% after 12 months of storage. Moisture, mass fraction of reducing sugars, and acidity remained stable in all samples. An antimicrobial test by *Escherichia coli* (strain 1257), *Staphylococcus aureus* (strain 209-P), and *Bacillus cereus* (strain 96) showed that the best inhibiting properties belonged to the samples of linden and buckwheat honey stored at 5 and 0°C for 12 months.
The optimal temperatures for long-term honey storage were in the range between 5 and 0°C. The results obtained can be used in updated honey storage standards.

Keywords. Honey, storage temperature, hydroxymethylfurfural, sugars, acids, enzymes, hydrogen peroxide, microorganisms

Finding. The research was a project by the Youth Laboratory for Natural Raw Material Processing as part of Strategic Academic Leadership Program Priority 2030 (No. 122122600056-9).

For citation: Gruznov DV, Gruznova OA, Sokhlikov AB, Lobanov AV. Effect of Low-Temperature Storage on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Honey. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(2):330–341. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2512

Введение

Натуральный пчелиный мед на протяжении многих веков считается не только ценным пищевым, но и лечебным продуктом с выраженной антимикробной активностью, которая обусловлена входящими в его состав моносахаридами, ферментами, органическими и неорганическими кислотами, фенольными соединениями [1–5]. По некоторым литературным данным, антимикробная активность меда зависит от содержания в нем пероксида водорода [6–8].

Полезные свойства меда сохраняются в течение длительного времени, но только при условии соблюдения определенных режимов его хранения. Согласно требованиям действующего ГОСТ 19792-2017 этот

продукт следует хранить в местах, недоступных воздействию прямых солнечных лучей, при температуре, не превышающей 20 °С, в плотно укупоренных ёмкостях 12 месяцев от даты проведения экспертизы, в герметично укупоренной таре 24 месяца от даты упаковки и 12 месяцев после вскрытия герметичной упаковки.

Существуют данные о хранении меда при низких температурах [9–12]. Данный подход используют для подавления брожения, которое может возникнуть в меде с содержанием влаги более 20 %, а также для предотвращения кристаллизации [9, 13, 16]. Воздействие низких температур (от 0 до –20 °С) в течение длительного времени приводит к замедлению химических процессов и стабилизации таких физико-химических показателей меда, как электропроводность, влажность, кислотность, содержание фенольных соединений [9]. Хранение меда при указанных температурах замедляет образование и накопление гидроксиметилфурфураля – продукта дегидратации моносахаридов, обладающего нейротоксическим, цитотоксическим, генотоксическим и мутагенным действиями [15–19].

Таким образом, хранение меда при низких температурах может быть перспективным для практического использования. Однако следует учитывать тот факт, что, стремясь к предотвращению накопления гидроксиметилфурфураля, нельзя забывать о потенциальном негативном воздействии низких температур на остальные физико-химические параметры меда, особенно те, которые обуславливают его антибактериальное действие.

Одними из самых распространенных и важных медоносов России, стран СНГ и Европы являются гречиха (гречиха посевная, *Fagopyrum esculentum* Moench.), липа (липа мелколистная, *Tilia cordata* Mill.) и подсолнечник (подсолнечник однолетний, *Helianthus annuus* L.). В России (преимущественно в лесостепной зоне европейской части страны, Алтайском крае, Забайкалье и Приморско-Амурском регионе), а также на территории Казахстана гречиха посевная обеспечивает получение свыше 50 % товарного меда [18]. Медопродуктивность гречихи может достигать 60–362 кг/га [19]. Другое ценнейшее медоносное растение – липа мелколистная, которая занимает большой ареал в зоне широколиственных лесов европейской части России, распространяясь до Урала, а также встречается в Крыму и на Кавказе. Ее медопродуктивность составляет в среднем 700–1000 кг/га [20]. Подсолнечник однолетний – медоносная и пыльценосная культура, обеспечивающая медосбор в России, в Казахстане, на Украине, а также в странах южной и юго-восточной Европы. Медопродуктивность находится на уровне 40–50 кг/га [21].

Целью исследования стало изучение влияния различных температурных условий хранения меда разного ботанического происхождения на его физико-химические и биологические показатели в течение длительного времени.

Объекты и методы исследования

Объект исследования – образцы подсолнечникового *Helianthus annuus* L. (n = 36), липового *Tilia cordata* Mill. (n = 31) и гречишного *Fagopyrum esculentum* Moench. меда (n = 34), поступившие в лабораторию ветеринарной санитарии и экологической безопасности в пчеловодстве ВНИИВСГЭ – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН из следующих регионов России: Ростовской, Волгоградской, Курской, Воронежской и Саратовской областей, а также из Краснодарского края в период 2021–2022 гг. Образцы хранились в климатических испытательных камерах М-60/100-500 КТВХ (АО «ЛОИП», РФ).

Монофлерность образцов меда подтверждали с помощью микроскопического анализа палинологического состава в соответствии с ГОСТ 31769-2012. Световую микроскопию образцов меда проводили с использованием тринокулярного микроскопа AmScope T390C («AmScope», КНР) при увеличении ×400. Фотографическое изображение пыльцевых зерен получали с помощью цифровой камеры Levenhuk M1000 PLUS («Levenhuk», США).

Массовую долю воды (влажность) исследуемых образцов определяли рефрактометрическим методом по ГОСТ 31774-2012 при помощи рефрактометра ИРФ-454 Б2М («ОАО «Казанский оптико-механический завод» (КОМЗ)», Россия).

Гидроксиметилфурфураль был детектирован методом ОФ-ВЭЖХ в соответствии с ГОСТ 31768-2012. Анализ проводился с использованием хроматографа Shimadzu LC-20 Prominence и колонки Eclipse XDB-C18 (150×4,6 мм, 5 мкм) с диодно-матричным детектором (диапазон одновременно детектируемых длин волн 210–400 нм), рабочая длина волны 283 нм, в градиентном режиме при скорости потока 1,0 мл/мин. Время удерживания пика – 3,83 мин. Использовали коммерческий гидроксиметилфурфураль с содержанием основного вещества не менее 99 % («Sigma-Aldrich», США), из которого приготавливали стандартные растворы с концентрациями 150,0, 100,0, 50,0, 30,0, 25,0, 20,0, 15,0, 10,0, 5,0 и 1,0 мкг/мл для построения калибровочной кривой. Растворы Карреза I и II для осаждения протеинов и стабилизации гидроксиметилфурфураля в водном растворе готовили согласно указанному ГОСТу.

Определение суммарной массовой доли редуцирующих сахаров (глюкозы и фруктозы) проводили по ГОСТ 32167-2013 колориметрическим методом. Сущность данного метода заключается в определении оптической плотности раствора железосинеродистого калия $K_3[Fe(CN)_6]$ (≥ 99,5 %, «ЛенРеактив», Россия) после его взаимодействия с редуцирующими сахарами меда. Анализ проводился на фотоколориметре КФК-2 («АО Загорский оптико-механический завод (ЗОМЗ)», Россия) при длине волны λ = 440 нм.

Для определения свободной кислотности провели титрование водных растворов образцов меда 0,1 М

раствором гидроксида натрия NaOH (99,2 %, «ЛенРеактив», Россия) до pH 8,30. Значение pH контролировали с помощью потенциометрического анализатора (pH-метра) Hanna edge с pH-электродом HI11310 («Hanna Instruments», США). Результаты выражали в миллиэквивалентах соляной кислоты в 1 кг меда – мэкв/кг.

Активность диастазы определяли на основе ГОСТ 34232-2017 колориметрическим методом и выражали в $см^3$ 1 % (мас.) раствора крахмала, расщепляемого за 1 ч амилолитическими ферментами, содержащимися в 1 г безводного вещества меда.

Определение активности каталазы осуществляли в соответствии с методикой, разработанной А. В. Аганиным. Согласно данной методике активность выражали в $мм^3$ кислорода, выделяющегося при воздействии каталазы, содержащейся в 1 г меда, на 10 мл 1 % (мас.) раствора H_2O_2 в течение 24 ч [22].

Активность D-глюкозо-1-оксидазы определяли по методу, описанному в работе I. Flanjak и соавторов [23]. Сущность данного метода заключается в восстановлении H_2O_2 до воды пероксидазой с использованием 3,3'-диметоксибензидина в качестве субстрата. Образовавшийся окрашенный продукт детектировался спектрофотометрически и имел максимальное поглощение при длине волны λ = 400 нм. Реакционная смесь состояла из 0,7 мл 2,14 мМ глюкозы (≥ 99,5 %, «Merck», Германия), растворенной в 100 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 6,1), 0,1 мл этанольного раствора 3,3'-диметоксибензидина (1 мг/мл) («Merck», Германия), 0,1 мл пероксидазы хрена («Serva», Германия), приготовленной в 100 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 6,1), и 0,1 мл раствора меда (0,2 г/мл), приготовленного в 100 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 6,1). После добавления раствора меда реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °C и останавливали добавлением 0,1 мл 1 М соляной кислоты – HCl (≥ 37 %, «ЛенРеактив», Россия). Поглощение смеси измеряли при OD_{400} нм (спектрофотометр ПЭ5400УФ, «Экросхим», Россия) против контрольного образца, состоящего из всех компонентов реакции, кроме меда. Затем измеренное поглощение корректировали по отношению к поглощению реакционной смеси нулевой минуты. Реакционная смесь нулевой минуты состояла из всех компонентов, но раствор меда вносили после добавления соляной кислоты. Результаты выражали в мкг H_2O_2/ч г меда.

Содержание H_2O_2 в меде определяли с помощью ранее адаптированного и модифицированного нами спектрально-иодометрического метода. Суть данного метода заключается в том, что при взаимодействии иодида калия с H_2O_2 в кислой среде выделяется молекулярный йод, образующий с избытком йодид-аниона комплексный анион, регистрируемый методом электронной абсорбционной спектроскопии [24]. Аналитические растворы образцов меда получали путем взвешивания 1,00 ± 0,01 г каждой пробы, после чего к ним добавляли по 2,0 мл воды ВЭЖХ («Химия XXI Век», Россия) и перемешивали в течение 3–5 мин на вихревом смесителе Vortex mixer VM-300S («Joan Lab Equipment», КНР) или ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Германия) до полного растворения. Из полученных аналитических растворов отбирали по 1,0 мл и добавляли 1,0 мл 0,2 М серной кислоты H_2SO_4 (≥ 93,6 %, «ЛенРеактив», Россия), после чего проводили пропускание диоксида углерода (ГОСТ 8050-85). На последнем этапе пробоподготовки к аналитическим растворам добавляли 5 % раствор йодида калия KI (99,5 %, «Русхим», Россия), через который заранее был пропущен диоксид углерода. Готовые аналитические растворы проб меда инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч в темном месте. Электронные спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра ПЭ5400УФ («Экросхим», Россия). Максимум поглощения наблюдался при λ = 351 нм.

Антимикробную активность исследуемых образцов меда до и на 12-м месяце хранения при указанных температурах определяли, используя метод диффузии в агар с микроорганизмами суточных тест-культур. В качестве тест-микроорганизмов брали *Escherichia coli* (штамм 1257), *Staphylococcus aureus* (штамм 209-P) и *Bacillus cereus* (штамм 96) (коллекция ВНИИВСГЭ – филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН). Из смыва каждой культуры готовили суспензию с количеством микробных клеток в 1 мл, равном 10^4 (количество устанавливалось по стандарту мутности), и высевали ее в предварительно подготовленные стерильные чашки Петри с мясо-пептонным агаром с лункой в центре (6 чашек на каждую пару микроорганизм – образец меда), в которые помещались образцы меда весом 0,10 ± 0,01 г. Посевы инкубировались в течение 24 ч при температуре 37 °C. Учет результатов проводился по диаметру зоны задержки роста вокруг образца меда. В качестве контроля использовались чашки Петри с тест-культурой, в которые не вносился образец меда.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения MS Excel 2010. Все измерения выполняли в 3-х повторностях. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Согласно ГОСТ 31766-2022 и ГОСТ 31766-2022 натуральный липовый и гречишный мед должны содержать не менее 30 % доминирующих пыльцевых зерен, подсолнечниковый мед – не менее 45 %. В соответствии с требованиями ГОСТ 31769-2012 общее количество пыльцевых зерен при проведении палинологического анализа должно составлять не менее 500.

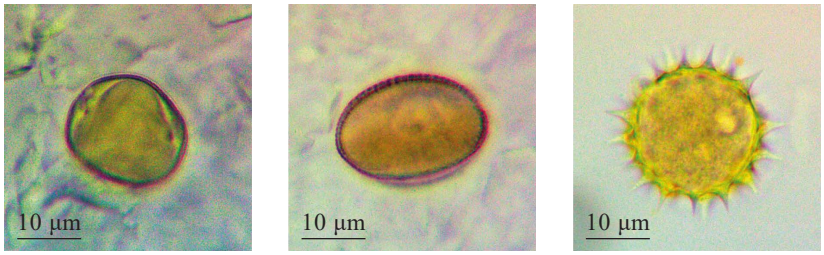
Изученные образцы полностью соответствовали указанным требованиям: общее количество пыльцевых зерен липового меда превышало 600, из них 42 ± 2 % были определены как пыльцевые зерна липы (*Tilia*). Результаты палинологического анализа проб гречишного и подсолнечникового меда были также поло-

жительными: общее количество пыльцевых зерен составило 620 и 680 соответственно. Из них доминирующих зерен было 45 ± 3 % (*Fagopyrum*) и 63 ± 2 % (*Helianthus*). На рисунке 1 представлены фотографии пыльцевых зерен указанных медоносов (×400).

Зерно липы мелколистной – трехбороздно-оровое, шаровидно-сплющенной формы, цвет светло-желтый. Гречиха посевная имеет эллипсоидальную форму, сетчатую скульптуру, цвет зерна темно-желтый. Зерно подсолнечника однолетнего золотистое, шаровидной формы с характерной шиповатой скульптурой, расположение шипов равномерное. Данное описание полностью совпадает с приведенными в литературных источниках характеристиками пыльцы этих медоносов [25, 26].

Перед закладкой на хранение образцов свежеоткачанного липового, гречишного и подсолнечникового меда провели оценку их физико-химических показателей (табл. 1).

Как видно из данных таблицы 1, все показатели, регламентируемые нормативными документами, находились в установленных пределах. Определение активности каталазы и D-глюкозо-1-оксидазы, а также содержания H_2O_2 в настоящее время не регулируется законодательством РФ. Однако существуют



a b c

Рисунок 1. Фотографические изображения пыльцевых зерен (×400): a – липа мелколистная (*Tilia cordata* Mill.), b – гречиха посевная (*Fagopyrum esculentum* Moench.), c – подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus* L.)

Figure 1. Pollen grain (×400): a – linden (*Tilia cordata* Mill.), b – buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.), c – sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Таблица 1. Анализ химического состава образцов липового, гречишного и подсолнечникового меда

Table 1. Chemical composition of linden, buckwheat, and sunflower honey samples

Анализируемый показатель	Регламентируемая норма	Образцы меда		
		Липовый	Гречишный	Подсолнечниковый
ГОСТ 31766-2022				
Влажность, %	не более 20,0*	18,2 ± 0,5	17,9 ± 0,7	16,8 ± 0,8
	не более 19,0**			
	не более 18,0***			
Суммарная массовая доля редуцирующих сахаров, %	не менее 66,0*	86,6 ± 3,9	86,8 ± 3,6	89,9 ± 1,6
	не менее 68,0**			
	не менее 71,0***			
Свободная кислотность, мэкв/кг	10,0–25,0*	24,6 ± 0,8	26,3 ± 1,1	25,1 ± 0,9
	10,0–40,0**			
	10,0–30,0***			
Диастазное число, ед. Готе	не менее 8,0*	17,5 ± 0,8	40,2 ± 0,8	16,5 ± 1,4
	не менее 18,0**			
	не менее 15,0***			
ГОСТ 19792-2017				
Массовая доля гидроксиметилфурфураля, мг/кг	не более 25,0	2,36 ± 0,11	3,25 ± 0,15	2,44 ± 0,10
Нерегламентированные показатели				
Каталаза, мм^3 O_2	–	330 ± 14	485 ± 22	850 ± 22
D-глюкозо-1-оксидаза, мкг H_2O_2/ч г	–	432,1 ± 10,5	385,9 ± 12,3	187,8 ± 9,1
Содержание H_2O_2, ×10^{-4} М	–	1,71 ± 0,05	1,48 ± 0,07	0,79 ± 0,03

Примечание. Требования нормативных документов для *липового меда, **гречишного меда, ***подсолнечникового меда.

Note: Standard requirements for *linden honey, **buckwheat honey, ***sunflower honey.

литературные источники, в которых приведены методики их определения, и данные, демонстрирующие успешность их применения при проведении анализа химического состава меда [22, 23, 27].

Для изучения изменений физико-химических и биологических показателей меда в процессе длительного хранения при разных температурных режимах полученные исходные значения были приняты за контрольные.

Одинаковые по массе (100,0 ± 0,1 г) навески образцов меда были помещены в стерильные полипропиленовые контейнеры с герметично завинчивающимися крышками и заложены на хранение в климатические камеры при температурах 18, 10, 5, 0, –5, –10 и –18 (± 2) °С, влажности 55 (± 3) % на срок 12 месяцев. Выбор температур обусловлен тем, что 18 ± 2 °С – максимальный предел температуры хранения меда, соответствующий требованиям ГОСТ (не более 20 °С), хранение при 10, 5, 0, –5, –10 и –18 (± 2) °С – моделирование воздействия низких температур, при которых наблюдались изменения в химическом составе меда. Полученная динамика представлена на рисунке 2.

Массовая доля гидроксиметилфурфураля во всех анализируемых образцах постепенно увеличивалась при всех температурах, за исключением –18 °С. Наиболее интенсивно этот процесс начинал протекать после 3-го месяца хранения. На графиках (рис. 2) можно отследить зависимость увеличения гидроксиметилфурфураля от температуры хранения. Максимальное содержание гидроксиметилфурфураля отмечалось в образцах, хранящихся при 18 °С. На 12-м месяце было установлено его повышение относительно исходного значения на 472,5 % в образцах липового меда и на 484,0 и 488,1 % – гречишного и подсолнечникового соответственно. Однако предельно допустимая концентрация (25 мг/кг) не была превышена. На протяжении всего периода исследований содержание гидроксиметилфурфураля было стабильно при –18 °С. В образцах липового и подсолнечникового меда в процессе хранения отмечалось небольшое его снижение: на 12-м месяце – на 5,9 и 2,5 % соответственно. Полученные данные согласуются с результатами исследований M. Kędzierska-Matysek с соавторами и I. N. Pasias с соавторами, в которых была продемонстрирована стабильность гидроксиметилфурфураля в образцах меда различного ботанического происхождения, хранящихся при отрицательных температурах, и повышение уровня этого показателя в пробах, подвергнутых хранению при комнатной температуре [9, 10].

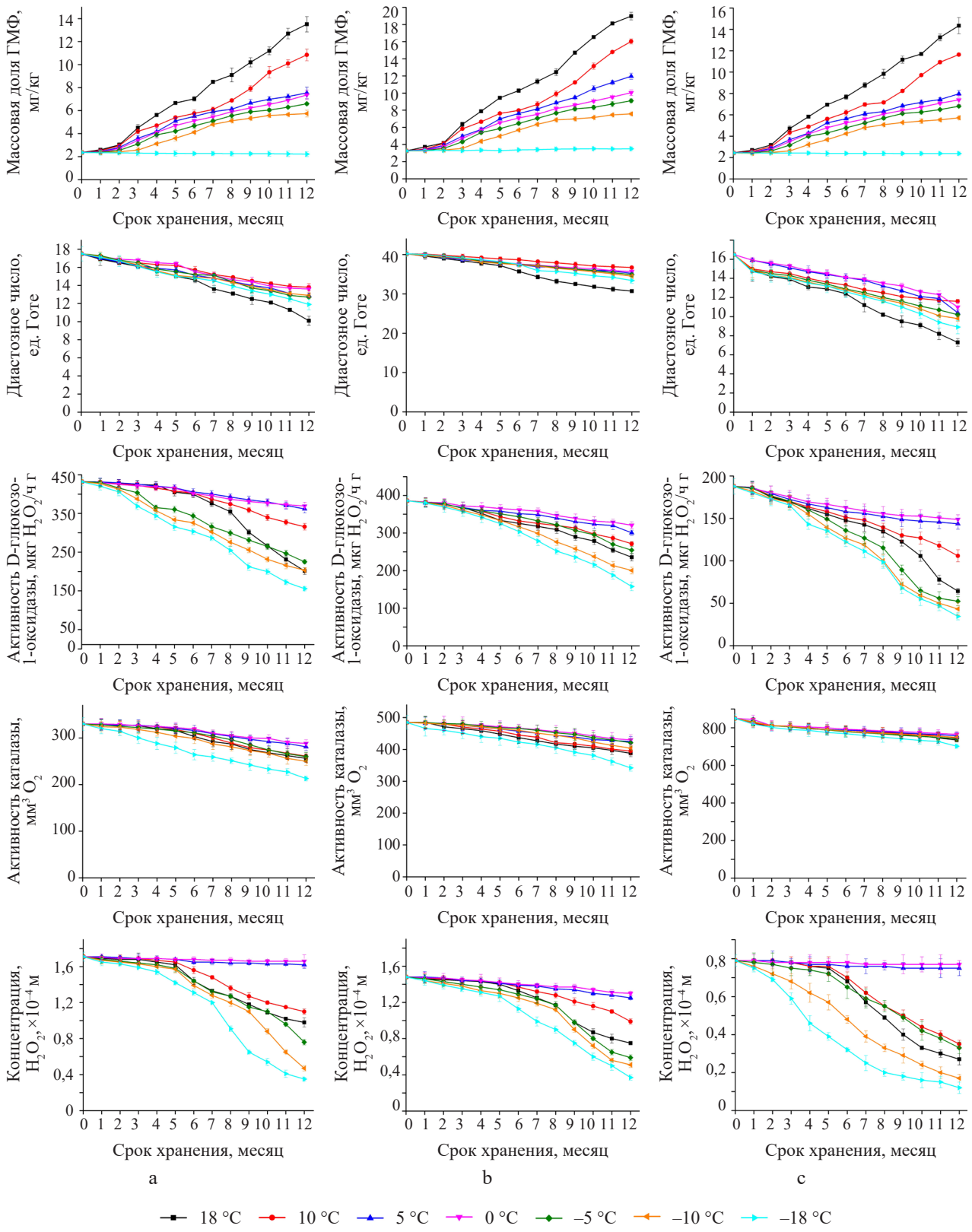
Снижение диастазной активности образцов меда наблюдалось уже на 1-м месяце хранения при всех температурных режимах (рис. 2). Однако для образцов гречишного меда, хранившихся при всех указанных температурах за весь период исследования, этот показатель находился в пределах, установленных нормативными документами. Та же тенденция прослеживалась и для липового меда, за исключением образцов, подвергнутых хранению в течение 12 месяцев при 18 °С (среднее отклонение от норматива 0,9 ед. Готе). Диастазное число образцов подсолнечникового меда было ниже допустимой нормы во всех вариантах эксперимента, кроме хранения при 0 и 5 °С в течение 3 месяцев.

В результате хранения при 18 °С диастазная активность всех образцов значительно снижалась к концу исследований. На 12-м месяце эксперимента в образцах липового меда она снизилась на 42,3 %, в образцах гречишного меда – на 66,4 %, подсолнечникового – на 55,8 %. Неблагоприятное влияние оказала температура –18 °С: на 12-м месяце в липовом меде диастазное число составило 11,90 ± 0,96 ед. Готе, что на 32,0 % меньше, чем до закладки на хранение, в гречишном – 33,4 ± 0,7 ед. Готе (разница с исходным значением 16,9 %), в подсолнечниковым – 8,9 ± 0,7 ед. Готе (разница составила 46,1 %). Минимальные изменения в этом параметре произошли при 0, 5 и 10 °С.

Как и диастазное число, активность D-глюкозо-1-оксидазы начинала падать на первом месяце хранения при всех температурных режимах (рис. 2). Интенсивность снижения активности фермента зависела от температуры хранения: максимальное снижение наблюдалось на 12-м месяце при –18 °С: на 64,0, 59,1 и 81,6 % (по сравнению с контролем) для образцов липового, гречишного и подсолнечникового меда соответственно. Значительные изменения (на 34,0–76,9 % в зависимости от ботанического происхождения меда) произошли в результате хранения при –10, –5 и 18 °С. Наиболее благоприятным режимом оказалось хранение при температурах 5 и 0 °С: на 12-м месяце исследований активность фермента снизилась всего на 14,6–23,5 %.

Анализ содержания фермента каталазы заложенных на хранение образцов меда продемонстрировал ее бóльшую устойчивость к воздействию как низких, так и комнатной температур, по сравнению с ферментами, описанными выше. Как и в случае с диастазой и D-глюкозо-1-оксидазой, на протяжении всего периода исследований отмечалось постепенно снижение активности каталазы. Этот процесс при всех температурных режимах протекал не так интенсивно (рис. 2). В образцах подсолнечникового меда, характеризующегося изначально высоким содержанием каталазы (850 ± 22 мм^3 O_2), отмечались минимальные изменения этого показателя: на 12-м месяце каталаза снизилась на 10,0–17,4 % в зависимости от температуры хранения. В образцах липового и гречишного меда, в которых начальный уровень каталазы был ниже (330 ± 14 и 485 ± 19 мм^3 O_2 соответственно), к концу эксперимента он снизился на 12,7–35,5 и 11,3–29,5 % соответственно. Независимо от ботанического происхождения, минимальные изменения активности фермента наблюдались при температурах 5 и 0 °С.

Содержание в образцах меда H_2O_2 было стабильно при температурах 5 и 0 °С: на 12-м месяце его концентрация в образцах липового меда снизилась на 5,3 и 2,9 %, в образцах гречишного – на 15,5 и 12,2 %, подсолнечникового – на 5,1 и 2,5 % соответственно.



Примечание: 0 месяцев – исходные данные (контроль), полученные до закладки образцов на хранение; ГМФ – гидроксиметилфурфураль

Рисунок 2. Изменение физико-химических параметров образцов липового (a), гречишного (b) и подсолнечникового (c) меда в процессе хранения в течение 12 месяцев при разных температурах

Figure 2. Physicochemical parameters of linden (a), buckwheat (b), and sunflower (c) honey samples during 12 months of storage at different temperatures

В образцах, хранящихся при 18 °С, значительное уменьшение H_2O_2 начиналось на 6-м месяце, что согласуется с ранее полученными нами данными, продемонстрировавшими снижение H_2O_2 в образцах липового меда на 5,6 % с момента откачки до 6-го месяца, а с 6-го до 12-го месяца – на 36,2 %; в образцах гречишного меда – на 4,7 и 44,3 % соответственно; в образцах подсолнечникового меда – на 7,3 и 57,6 % соответственно.

Такая же тенденция прослеживалась и для образцов, подвергнутых хранению при 10 и –5 °С. В то же время хранение при –10 и –18 °С приводило к понижению этого показателя уже на первом месяце (рис. 2). Произошедшие в процессе хранения изменения с H_2O_2 могут быть обусловлены следующими факторами: нестабильностью молекулы H_2O_2 при температурах, выходящих за диапазон 0–5 °С; снижением при 18 °С, а также низких температурах активности D-глюкозо-1-оксидазы, под воздействием которой H_2O_2 образуется в меде в результате двухстадийной окислительно-восстановительной реакции; относительной стабильностью фермента каталазы, гидролизующей H_2O_2 до воды и кислорода [7].

В результате 12-месячного хранения образцов меда при указанных температурах влажность, суммарная массовая доля редуцирующих сахаров и свободная кислотность значительно не изменились (отличие от контроля менее 5 %) и находились в пределах, регламентированных нормативными документами. В связи с этим в таблице 2 приведены данные, полученные в конце эксперимента – на 12-м месяце хранения, а также исходные значения этих показателей (контроль).

Максимальное снижение влажности образцов липового меда составило 4,9 % при температуре 18 °С (относительно контроля), гречишного и подсолнечникового меда – 4,5 и 4,8 % соответственно при той же температуре. Минимальные отклонения от исходных значений наблюдались при 0 °С и отрицательных температурах. Полученные результаты согласуются с данными, полученными M. Kędzierska-Matysek с соавторами [9]. Стабильность влажности образцов, хранящихся при низких температурах, может объясняться более быстрым переходом молекул воды в связанную форму [28].

Та же тенденция прослеживалась и в отношении редуцирующих сахаров: их наименьшее количество отмечалось в анализируемых образцах, подвергнутых хранению при 18 °С. Для образцов липового и гречишного меда отклонение составило 3,3 %, подсолнечникового – 1,7 %. По данным G. P. Ribeiro и др., содержание редуцирующих сахаров в образцах меда, хранящихся при –18 °С в течение 180 суток, изменилось на 4,9 % [11]. Результаты, представленные в работе С. Н. Есенкиной, продемонстрировали отклонение этого показателя на 4,2 % после 3-месячного хранения при аналогичной температуре [29].

Свободная кислотность за 12 месяцев при всех температурах, наоборот, незначительно повысилась.

Таблица 2. Содержание влажности, редуцирующих сахаров и свободной кислотности в образцах липового, гречишного и подсолнечникового меда, хранившихся при разных температурах в течение 12 месяцев

Table 2. Moisture, reducing sugars, and free acidity in linden, buckwheat, and sunflower honey samples stored at different temperatures for 12 months

Анализируемый показатель	Контроль	Температура хранения, °С						
		18	10	5	0	–5	–10	–18
Липовый мед								
Влажность, %	18,2 ± 0,5	17,3 ± 0,2	17,4 ± 0,2	17,4 ± 0,2	17,4 ± 0,3	17,5 ± 0,3	17,6 ± 0,3	17,9 ± 0,6
Суммарная массовая доля редуцирующих сахаров, %	86,6 ± 3,9	83,8 ± 3,7	84,5 ± 2,9	84,6 ± 1,7	84,8 ± 3,5	85,1 ± 3,8	85,2 ± 3,5	85,7 ± 2,3
Свободная кислотность, мэкв/кг	24,6 ± 0,8	25,7 ± 1,2	25,6 ± 0,3	25,5 ± 1,2	25, 5 ± 0,9	25,4 ± 0,7	24,8 ± 0,6	24,7 ± 0,2
Гречишный мед								
Влажность, %	17,9 ± 0,7	17,1 ± 0,5	17,2 ± 0,6	17,3 ± 0,5	17,4 ± 0,4	17,5 ± 0,7	17,8 ± 0,3	17,8 ± 0,5
Суммарная массовая доля редуцирующих сахаров, %	86,8 ± 3,6	83,9 ± 1,3	84,3 ± 2,6	84,9 ± 2,4	85,3 ± 2,8	85,6 ± 2,8	86,2 ± 1,9	86,7 ± 3,1
Свободная кислотность, мэкв/кг	26,3 ± 1,1	27,3 ± 0,7	27,1 ± 0,9	27,0 ± 0,5	26,9 ± 1,3	26,8 ± 1,1	26,8 ± 1,2	26,6 ± 0,6
Подсолнечниковый мед								
Влажность, %	16,8 ± 0,8	16,0 ± 0,2	16,1 ± 0,3	16,2 ± 0,1	16,2 ± 0,1	16,2 ± 0,2	16,3 ± 0,3	16,4 ± 0,2
Суммарная массовая доля редуцирующих сахаров, %	89,9 ± 1,6	88,4 ± 1,4	89,4 ± 2,7	89,5 ± 2,9	89,6 ± 3,1	89,7 ± 2,8	89,8 ± 2,5	89,8 ± 3,8
Свободная кислотность, мэкв/кг	25,1 ± 0,9	25,8 ± 1,3	25,6 ± 1,2	25,6 ± 0,8	25,5 ± 1,2	25,4 ± 0,7	25,3 ± 0,9	25,2 ± 1,1

Была выявлена следующая закономерность: чем выше температура хранения, тем выше значение кислотности. При 18 °C этот показатель увеличился на 4,5 % для липового меда, на 3,8 % для гречишного и на 2,7 % для подсолнечникового. F. Braghini с соавторами отметили такую же тенденцию при исследовании меда, хранящегося при 22 °C [12].

Изменения, произошедшие с содержанием редуцирующих сахаров и свободной кислотностью, обусловлены скоростью прохождения процесса дегидратации, в результате которого из моносахаров образуются более простые соединения, в том числе органические кислоты, а также гидроксиметилфурфураль (что объясняет его стабилизацию низкими температурами). К тем же выводам пришли M. Kędzierska-Matysek и др., которые в своем исследовании рапсового меда показали, что при понижении температуры хранения этого продукта химические реакции протекали в нем гораздо медленнее [9].

С целью изучения влияния температурных условий при длительном хранении меда на его антимикробное действие был проведен тест на *Escherichia coli* (штамм 1257), *Staphylococcus aureus* (штамм 209-P) и *Bacillus cereus* (штамм 96, вегетативная форма). Данные микроорганизмы являются наиболее распространенными тест-культурами при проведении микробиологических исследований, а также исследовании различных биохимических механизмов. *E. coli* и *S. aureus* известны как контаминанты слизистого и кожного эпителия человека и животных, поэтому при определенных условиях могут вызывать воспалительные процессы и пищевые отравления. *B. cereus*, хотя и является представителем почвенных бактерий, может также быть причиной токсикоинфекций [30–33].

Исследуемые образцы свежеоткачанного меда разного ботанического происхождения оказывали ингибирующее действие на рост всех тест-культур (рис. 3).

Антимикробная активность липового меда в отношении *S. aureus* (средний диаметр зоны задержки роста 38 мм) превосходила действие на *E. coli* (32 мм) и *B. cereus* (23 мм). Гречишный мед оказывал бóльшее ингибирующее влияние на *S. aureus* (31 мм), чем на *E. coli* (26 мм) и *B. cereus* (19 мм). Подсолнечниковый мед подавлял рост *S. aureus* (20 мм) в большей степени, чем *E. coli* (18 мм) и *B. cereus* (12 мм).

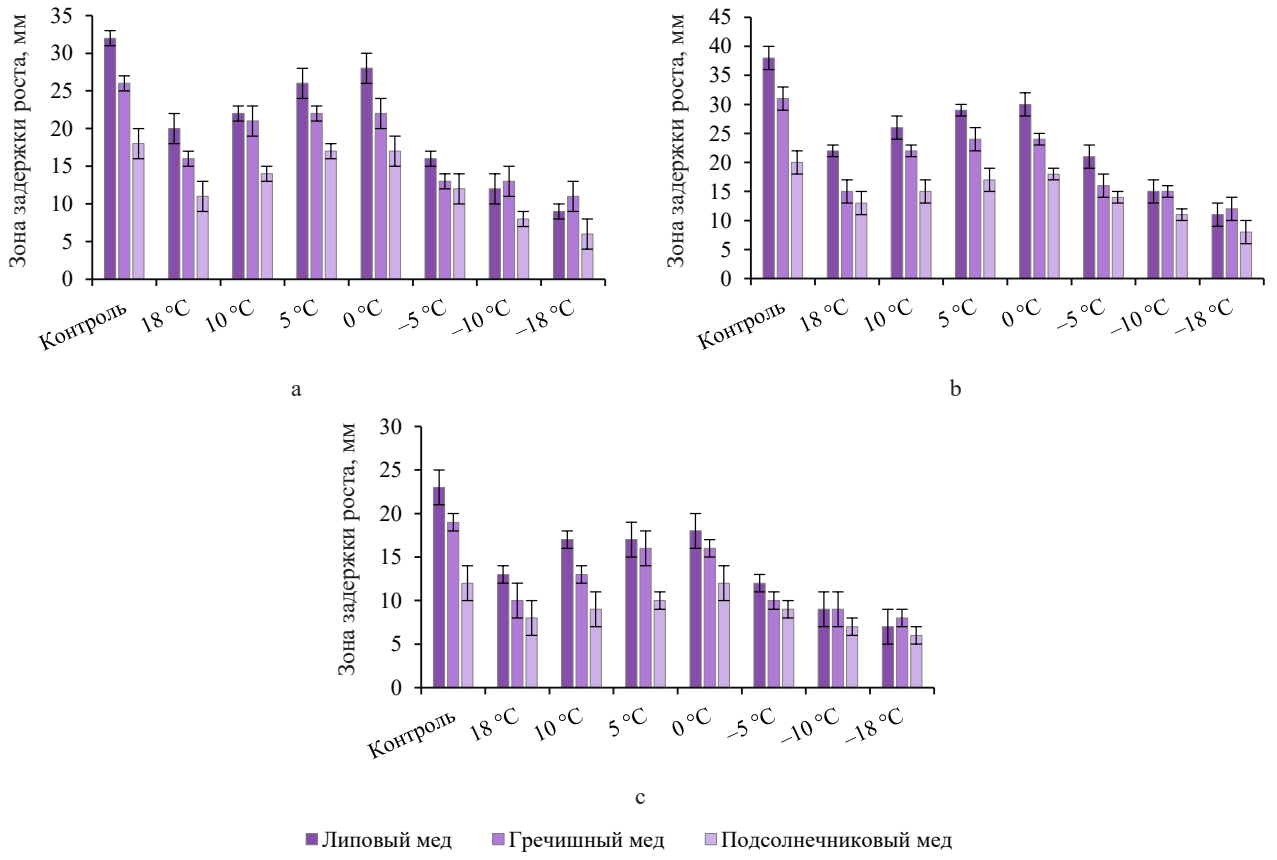


Рисунок 3. Ингибирование роста *Escherichia coli* (a), *Staphylococcus aureus* (b) и *Bacillus cereus* (c) образцами липового, гречишного и подсолнечникового меда: до закладки на хранение (контроль), а также на 12-м месяце хранения при температурах 18, 10, 5, 0, –5, –10 и –18 °C

Figure 3. Growth inhibition of *Escherichia coli* (a), *Staphylococcus aureus* (b), and *Bacillus cereus* (c) by linden, buckwheat, and sunflower honey: before storage (control) and after 12 months of storage at 18, 10, 5, 0, –5, –10, and –18°C

Золотистый стафилококк показал наименьшую устойчивость к меду, независимо от его ботанического происхождения, что объясняется различной резистентностью микроорганизмов к влиянию внешних факторов.

Во всех образцах меда, в зависимости от температуры хранения в течение 12 месяцев, наблюдалось падение антимикробной активности. Уровень ее снижения от большего к меньшему соответствовал следующим температурам: –18, –10, –5, 18, 10, 5 и 0 °С. Данная зависимость прослеживалась для всех видов меда.

Средняя степень снижения антимикробной активности липового меда (по сравнению с контролем) в отношении *S. aureus* при –18 и 0 °С составила 71 и 21 % соответственно; в отношении *E. coli* – 72 и 12,5 %; *B. cereus* – 69,5 и 21,7 %. Ингибирующее действие гречишного меда в отношении *S. aureus* снизилось на 61,3 и 22,6 % при –18 и 0 °С соответственно; в отношении *E. coli* – на 57,7 и 15,4 %; *B. cereus* – на 57,9 и 15,8 %. Та же тенденция отмечалась и для подсолнечникового меда: 60,0 при –18 °С и 10,0 % при 0 °С для *S. aureus*; 66,7 и 5,5 % для *E. coli*; 50,0 и 0,0 % (без учета отклонения от среднего значения) для *B. cereus*.

Снижение антимикробной активности можно объяснить уменьшением в исследуемых образцах меда концентрации H_2O_2, который является стабильной активной формой кислорода, вызывающей оксидативный стресс микробной клетки [34]. Образцы с низким содержанием H_2O_2 продемонстрировали меньший ингибирующий эффект в отношении всех трех микроорганизмов.

Выводы

Проводимый в течение 12 месяцев физико-химический и биологический анализ образцов липового, гречишного и подсолнечникового меда, хранящегося при разных температурах, позволил выявить определенные изменения в химическом составе и биологической активности исследуемых образцов.

Положительным результатом применения отрицательных температур (–5, –10 и особенно –18 °С) для длительного хранения меда стало замедление скорости химических процессов, что обусловило минимальные изменения в содержании токсичного соединения – гидроксиметилфурфураля. Однако такие температурные режимы хранения негативно влияли на ферментативную активность и концентрацию H_2O_2, которые, наряду с содержанием сахаров и кислот, являются факторами антимикробной активности меда. Подобные изменения произошли и с образцами, хранящимися при 18 и 10 °С, в которых отмечалось более высокое содержания гидроксиметилфурфураля. Менее интенсивно химические процессы протекали при 5 и 0 °С. Содержание гидроксиметилфурфураля в образцах, хранившихся при данных температурах в течение 12 месяцев, составило, в зависимости от ботанического происхождения меда, от 7,37 до 11,97 мг/кг, что значительно ниже предельно допустимой концентрации.

На 12-м месяце хранения все образцы меда соответствовали требованиям нормативных документов по всем показателям. Исключение составила диастазная активность в образцах подсолнечникового меда. Однако проведенный тест по изучению антимикробной активности меда в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus* продемонстрировал, что наибольшим ингибирующим действием обладали образцы, хранившиеся при 5 и 0 °С. Таким образом, данные температуры представляются оптимальными для хранения меда в течение длительного времени.

Полученные результаты могут быть использованы в качестве дополнительных рекомендаций при внесении изменений в нормативную документацию, регулирующую требования к хранению этого продукта.

Критерии авторства

Авторы в равной степени принимали участие в исследовании и оформлении рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

The authors contributed equally to the research and the manuscript.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Refences/Список литературы

1. Seraglio SKT, Schulz M, Brugnerotto P, Silva B, Gonzaga LV, Fett R, *et al.* Quality, composition and health-protective properties of citrus honey: A review. Food Research International. 2021;143:110268. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110268

2. Proaño A, Coello D, Villacrés-Granda I, Ballesteros I, Debut A, Vizuete K, *et al.* The osmotic action of sugar combined with hydrogen peroxide and bee-derived antibacterial peptide Defensin-1 is crucial for the antibiofilm activity of eucalyptus honey. LWT. 2021;136(2):110379. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110379

3. Bucekova M, Jardekova L, Juricova V, Bugarova V, di Marco G, Gismondi A, *et al.* Antibacterial activity of different blossom honeys: New findings. Molecules. 2019;24(8):1573. https://doi.org/10.3390/molecules24081573

4. Almasaudi S. The antibacterial activities of honey. Saudi Journal of Biological Sciences. 2021;28(4):2188–2196. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.017

5. Ayoub WS, Ritu, Zahoor I, Dar AH, Farooq S, Mir TA, *et al.* Exploiting the polyphenolic potential of honey in the prevention of chronic diseases. Food Chemistry Advances. 2023;3:100373. https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100373

6. Alygizou A, Grigorakis S, Gotsiou P, Loupassaki S, Calokerinos AC. Quantification of hydrogen peroxide in cretan honey and correlation with physicochemical parameters. Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2021;2021(1):5554305. https://doi.org/10.1155/2021/5554305

7. Brudzynski KA current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review. Food Chemistry. 2020; 332:127229. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127229

8. Mohammed MEA, Alarjany W, Suleiman MHA, Al-Gramah HA. Hydrogen peroxide and dicarbonyl compounds concentration in honey samples from different botanical origins and altitudes in the South of Saudi Arabia. Current Research in Nutrition and Food Science. 2019;7(1):150–160. https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.7.1.15

9. Kędzierska-Matysek M, Florek M, Wolanciuk A, Skałecki P. Effect of freezing and room temperatures storage for 18 months on quality of raw rapeseed honey (*Brassica napus*). Journal of Food Science and Technology. 2016;53(8):3349–3355. https://doi.org/10.1007/s13197-016-2313-x

10. Pasias IN, Raptopoulou KG, Makrigennis G, Ntakoulas DD, Lembessis D, Dimakis V, *et al.* Finding the optimum treatment procedure to delay honey crystallization without reducing its quality. Food Chemistry. 2022;381:132301. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132301

11. Ribeiro GP, Villas-Bôas JK, Spinosa WA, Prudencio SH. Influence of freezing, pasteurization and maturation on Tiúba honey quality. LWT. 2018;90:607–612. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.072

12. Braghini F, Biluca FC, Ottequir F, Gonzaga LV, da Silva M, Vitali L, *et al*. Effect of different storage conditions on physicochemical and bioactive characteristics of thermally processed stingless bee honeys. LWT. 2020;131:109724. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109724

13. Ji P, Liu X, Yang Ch, Wu F, Sun J, Cao W, *et al.* Natural crystallization properties of honey and seed crystals-induced crystallization process for honey performance enhancing. Food Chemistry. 2023;405:134972. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134972

14. Villacrés-Granda I, Proaño A, Coello D, Debut A, Vizuete K, Ballesteros I, *et al*. Effect of thermal liquefaction on quality, chemical composition and antibiofilm activity against multiresistant human pathogens of crystallized eucalyptus honey. Food Chemistry. 2021;365(15):130519. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130519

15. Besir A, Yazici F, Mortas M, Gul O. A novel spectrophotometric method based on Seliwanoff test to determine 5-(Hydroxymethyl) furfural (HMF) in honey: Development, in house validation and application. LWT. 2021;139:110602. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110602

16. Salhi I, Samet Y, Trabelsi M. Direct electrochemical determination of very low levels of 5-hydroxymethyl furfural in natural honey by cyclic and square wave voltammetric techniques. Journal of Electroanalytical Chemistry. 2020;837:114326.

17. Laolue P, Lerdsri J. Development of square wave voltammetry method using working electrodes modified with nickel oxide and carbon black for determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. Journal of Food Composition and Analysis. 2023;124:105699. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105699

18. Esenkina SN. Useful properties of buckwheat honey. Beekeeping. 2022;(2):50–51. (In Russ.). [Есенкина С. Н. Полезные свойства гречишного меда // Пчеловодство. 2022. № 2. С. 50–51.]. https://www.elibrary.ru/FMRAMY

19. Naumkin VP. Bees on buckwheat. Beekeeping. 2002;(5):20–21. (In Russ.). [Наумкин В. П. Пчелы на гречихе // Пчеловодство. 2002. № 5. С. 20–21.]. https://elibrary.ru/YOGKFP

20. Yakimov MV, Absalyamov RR, Yakimov DV. Influence of weather conditions on honey yield during flowering period of small-leaved linden in Udmurt republic. Forestry Bulletin. 2022;26(1):41–49. (In Russ.). https://doi.org/10.18698/2542-1468-2022-1-41-49; https://elibrary.ru/NHMMVT

21. Mazalov VI, Naumkin VP. Crop yield of new sunflower varieties and hybrids. Beekeeping. 2021;(6):24–25. (In Russ.). [Мазалов В. И., Наумкин В. П. Урожайность новых сортов и гибридов подсолнечника // Пчеловодство. 2021. № 6. С. 24–25.]. https://elibrary.ru/OLSGDL

22. Aganin AV. Honey studies. Saratov: Izdatel'stvo Saratovskogo universiteta; 1985. 152 p. (In Russ.). [Аганин А. В. Мед и его исследование. Саратов: Саратовский университет, 1985. 152 с.].

23. Flanjak I, Strelec I, Kenjerić D, Primorac L. Croatian produced unifloral honeys characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. Journal of Apicultural Science. 2015;60(1):39–48. https://doi.org/10.1515/jas-2016-0005

24. Lobanov AV, Rubtsova NA, Vedeneeva YuA, Komissarov GG. Photocatalytic activity of chlorophyll in hydrogen peroxide generation in water. Doklady Chemistry. 2008;421(2):190–193. https://doi.org/10.1134/S0012500808080065

25. Burmistrov AN, Nikitina VA. Honey plants and their pollen. Moscow: Rosagropromizdat; 1990. 192 p. (In Russ.). [Бурмистров А. Н., Никитина В. А. Медоносные растения и их пыльца. М.: Росагропромиздат, 1990. 192 с.].

26. Karpovich I, Drebezgina E, Elovikova E, Legotkina G, Zubova E, Kuzyaev R, *et al.* Atlas of pollen grains. Ekaterinburg: Uralsky Rabochiy; 2015. 320 p. (In Russ.). [Карпович И. В., Дребезгина Е. С., Еловикова Е. А. Атлас пыльцевых зерен. Екатеринбург: Уральский рабочий, 2015. 320 с.].

27. Gruznova OA, Lobanov AV, Sokhlikov AB, Gruznov DV. Determination of the correlation between the content of 5-hydroxymethylfurfural and hydrogen peroxide in honey. Chemical Safety Science. 2022;6(2):215–226. (In Russ.). https://doi.org/10.25514/CHS.2022.2.23014

28. Bakier S. Characteristics of water state in some chosen types of honey found in Poland. Acta Agrophysica. 2006; 7(1):7–15.

29. Esenkina SN. The impact of negative temperatures on honey quality. Beekeeping. 2022;(3):49–50. (In Russ.). [Есенкина С. Н. Действие отрицательных температур на качество меда // Пчеловодство. 2022. № 3. С. 49–50.]. https://www.elibrary.ru/GMRNYZ

30. Krupyanskii YuF, Generalova AA, Kovalenko VV, Loiko NG, Tereshkin EV, Moiseenko AV, *et al.* DNA condensation in bacteria. Russian Journal of Physical Chemistry B. 2023;17(3):517–533. https://doi.org/10.1134/S1990793123030211

31. Chhawchharia A, Haines RR, Green KJ, Barnett TC, Bowen AC, Hammer KA. *In vitro* antibacterial activity of Western Australian honeys, and manuka honey, against bacteria implicated in impetigo. Complementary Therapies in Clinical Practice. 2022;49:101640. https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2022.101640

32. Bucekova M, Godocikova J, Kohutova L, Danchenko M, Barath P, Majtan J. Antibacterial activity and bee-derived protein content of h oney as important and suitable complementary tools for the assessment of honey. Journal of Food Composition and Analysis. 2023;123:105610. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105610

33. Rahnama H, Azari R, Yousefi MH, Berizi E, Mazloomi SM, Hosseinzadeh S, *et al.* A systematic review and metaanalysis of the prevalence of *Bacillus cereus* in foods. Food Control. 2023;143:109250. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109250

34. Faúndez X, Báez ME, Martínez J, Zúñiga-López MC, Espinoza J, Fuentes E. Evaluation of the generation of reactive oxygen species and antibacterial activity of honey as a function of its phenolic and mineral composition. Food Chemistry. 2023;426:136561. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136561