



Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université ABDELHAMID IBN BADIS - Mostaganem -

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences biologiques

*Laboratoire de pharmacognosie et Api-phytothérapie. Université
ABDELHAMID IBN BADIS - Mostaganem – 27000, (Algérie).*

THESE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat En Sciences

Spécialité : Microbiologie médicale

Présenté par :

M^r : AHMED Moussa

**Caractérisation, Propriétés Physico-chimiques, Qualités
Microbiologiques et Valeur Thérapeutique de Quelques
Miels de l'ouest Algérien**

Soutenue publiquement le 08/01/2014

Devant le jury composé de:

Président	Mr Lotmani Brahim	Professeur à l'université de Mostaganem
Directeur de thèse	Mr Djebli Noureddine	Professeur à l'université de Mostaganem
Examineur	Mr Aoues AEK	Professeur à l'université d'Oran
Examineur	Mr Slimani Miloud	Professeur à l'université de Saïda
Examineur	Mr Sahraoui Tewfik	Professeur à l'université d'Oran
Examineur	Mr Kacem Brahim	Maître de conference A à l'université de Mostaganem

Année universitaire 2013-2014

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَأَوْحَىٰ رُؤُوسَ إِلَٰهِي النَّخْلِ أَنْ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ

وَمِمَّا يُغْرِشُونَ (68) ثُمَّ خَلِي مِنَ حُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْأَلِي سِئْلَ رُؤُوسِ

ذَٰلِكَ يُخْرِجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ

فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (69)

سورة النحل

Communications et Publications scientifiques

Une partie des résultats de ce travail a été présentée sous forme de posters dans différents congrès, et fait l'objet de plusieurs publications scientifiques.

Articles scientifiques intégrés dans la thèse.

1. **Ahmed M.**, Djebli N, Aissat S, Bacha S, Meslem A and Khiati B, (2013). *In vitro* activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity. *Asian Pac J Trop Biomed* ; 3(10): 816-821.
2. **Ahmed M.**, Djebli N, Aissat S, Bacha S, Meslem A and Khiati B, (2013) Synergistic Inhibition of Natural Honey and Potato Starch and their Correlation with Diastase Number and Sugar Content Against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736. *Clinical Microbiology: Open Access*
3. **Ahmed M.**, Djebli N, Aissat S, Meslem A, Khiati B. (2013). Antimycotic Activity of Natural Honey and their Combination with Curcuma Starch against *Candida albicans* in correlation with flavonoid contents and diastase activity. *Journal of Biologically Active Products from Nature TBAP 3 (4) : 259 - 265* <http://www.tandfonline.com/loi/tbap20>
4. **Ahmed M.**, Djebli N, Aissat S, (2013). *In vitro* synergistic antibacterial activity of Natural Honey Combined with Curcuma Starch and Their Correlation with Diastase Number, Flavonoid and Polyphenol content. *J Plant Pathol Microb.*4-1 dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000152
5. **Ahmed M.**, Djebli N, Aissat S, Khiati B, Ünal M, Bacha S (2012). Antiradical Activity and Total Phenolics of Algerian Honeys and Antibacterial Effect Against Gram-Negative Bacteria. *J Microb Biochem Technol* 4: 152-156. [doi:10.4172/1948-5948.1000087](http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000087).
6. **Ahmed M.**, Djebli N, Aissat S, Meslem A, Bacha S. (2012). The Influence of Botanical Origin and Physicochemical Parameters on the Antifungal Activity of Algerian Honey. *J Plant Pathol Microb*: 3:5 dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000132.
7. **Ahmed M.**, Djebli N, Aissat S, Douichene S. (2012). The Relationship between fructose, glucose and maltose content with Diastase number and anti-Pseudomonas activity of natural honey combined with potato starch. *Organic Chem Curr Res* ; 1:6. dx.doi.org/10.4172/2161-0401.1000111.
8. **Ahmed M.**, Djebli N, Aissat S, Meslem A. (2012). Anti-*Aspergillus niger* of eucalyptus honey influenced by thermal treatment. *Scientific Reports*. 1:2. dx.doi.org/10.4172/scientificreports.175.

9. **Ahmed M**, Djebli N, Aissat S, Meslem A. (2012).Influence of temperature on the inhibitory potency of Eucalyptus honey against *Candida albicans* *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 1-4.
10. **Ahmed M**, Djebli N, Meslem AM, Aissat S.(2012).Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram-Positive cocci: *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Asian Pac J Trop Med* . 773-776. doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60141-2.PubMed
11. **Ahmed M**, Djebli N, Meslem A, Aissat S. (2012).Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram-Negative Bacilli : *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Disease* .211-214.
12. **Ahmed M** , Djebli N , Aissat S, Meslem A , Benhalima A. (2012).Antifungal Activity of Four Honeys of Different Types From Algeria Against Pathogenic Yeast : *Candida albicans* and *Rhodotorula sp.* *Asian Pac J Biomed* (2: 7) 554–557.
13. **Ahmed M**, Djebli N, Hammoudi SM, Aissat S, Akila B, Hemida H.(2012) Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. *Asian Pac J Trop Biomed dx.doi.org/10.1016/S2221-1691 (12)60018-5*. PubMed

Communications à congress

1. The 4^o PCBS & 1st ADNP 2013 University of Bechar, Algeria
2. The International Days of Biotechnology 19-22 December 2011. Sousse, Tunisia.
3. International Symposium Issue of the emergence of multi-resistant bacteria to antibiotics and new therapeutic approaches. From 07 to 08-October-2011. Meknes, Morocco.
4. 4th International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. 12-13 May 2011, Mohammedia, Morocco.

Remerciements

Je remercie tout d'abord Professeur **Djebli Nouredine** d'avoir accepté de diriger mes travaux de thèse, durant ces trois années, en me faisant bénéficier de leur expérience, leurs conseils et leurs encouragements. Je le remercie également de m'avoir donné la possibilité de présenter mes résultats dans différents congrès internationaux et dans plusieurs publications scientifiques.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur **Lotmani Brahim** de l'Université de Mostaganem., pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie également Monsieur **Aoues AEK**. Professeur à l'Université d'Oran., pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Monsieur **Sahraoui Tewfik**. Professeur à l'Université d'Oran., d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ma gratitude va également à Monsieur **Slimani Miloud**. Professeur à l'Universitaire de Saïda., pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury.

Je souhaite exprimer mes remerciements à Docteur **Kacem Brahim** .Maître de Conférences à l'Université de Mostaganem., pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens sincèrement à remercier **Aissat Saad** collègue et ami pour le soutien qu'elle m'a toujours apporté. Mes collègues enseignants (**Meslem et Khiati**)

Ce travail est dédié tout particulièrement à mes parents pour leur amour et soutien perpétuel et infaillible.

Je ne saurais oublier mes collègues doctorants, post-doctorants, que j'ai eu la chance de rencontrer durant ces années.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table des matières

RESUME.....	I
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	II
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES FIGURES	IV

Introduction générale.....	1
Synthèse bibliographique.....	3

Première partie : Origine botanique et composition physico-chimique

Introduction	24
---------------------------	----

Matériel et Méthodes

I.1. Echantillons de miel.....	26
I.2. Origine botanique (Mélissopalynologie).....	26
I.3. Analyses physico-chimiques.....	26
I.3.2. pH.....	28
I.3.1. Teneur en eau.....	28
I.3.3. Conductivité électrique (mS/cm).....	28
I.3.4. Détermination de l'acidité.....	29
I.3.5. Activité de l'invertase (Indice de saccharase).....	30
I.3.6. Hydroxy-Méthyl-Furfural (HMF).....	30
I.3.7. Activité de la diastase ou amylase.....	30
I.3.8. Spectre des sucres.....	31

Résultats et discussion

I.1. Origine botanique.....	32
I.2. Composition physico-chimique.....	33
I.2.1. Teneurs en eau.....	33
I.2.2. pH et Acidité libre.....	33
I.2.3. Conductivité électrique.....	34
I.2.4. Indice de saccharase.....	34
I.2.4. Activité diastasique.....	34
I.2.4. Teneur en HMF.....	34
I.2.5. Carbohydrates.....	37

I.3. Discussion	37
I.3.1. Analyse pollinique	37
I.3.2. Analyses physico-chimiques	38
❖ Teneur en eau.....	38
❖ pH et acidité libre.....	38
❖ Conductivité électrique.....	39
❖ Diastases.....	40
❖ Invertases.....	40
❖ HMF...../.....	40
❖ Carbohydrates.....	42
Publication N° 1 (Premeire partie)	43

Deuxième partie : Effet antioxydant

Matériel et Méthodes

Introduction	42
II.1. Taux des polyphénols totaux (réactif de Folin Ciocalteu)	43
II.2. Taux des flavonoïdes totaux	44
II.3. Activité antiradicalaire des miels (piégeage de radical libre DPPH)	44
II.4. Pouvoir réducteur : Essai FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	46
II.5. Analyse statistique	46

Résultats et discussion

II.1. Taux des polyphénols et des flavonoïdes totaux	49
II.1. Taux des flavonoïdes totaux	49
II. 2. Activité antioxydante	
II. 2.1. Activité antiradicalaire des miels (piégeage de radical libre DPPH)	50
II.2.3. Pouvoir réducteur	51
II. 3. Analyse statistique	51
❖ Corrélation entre les teneurs (flavonoïdes, polyphénols) et l'efficacité antiradicalaire...56	
❖ Corrélation entre les teneurs (flavonoïdes, polyphénols) et pouvoir réducteur (FRAP)..57	

Publication N° 2 (Deuxieme partie)	58
---	----

Troisième partie : Propriétés antimicrobiennes

Introduction	58
III. Techniques et méthodes expérimentales	60
III.1. Matériel	60
III.1.2. Préparation de l'inoculum	60
III.1.1. Milieux de culture	60
❖ Bactéries.....	60
❖ Levures.....	61
III.1.3. Préparation des solutions du miel	61
III.2. Techniques d'étude du pouvoir antibactérien	61
III.2.1. Techniques de diffusion en milieu solide	61
❖ Méthode des puits.....	61
❖ Méthode des disques.....	62
❖ Technique du spectrophotomètre (Pourcentage d'inhibition).....	62
III.2.2. Détermination des CMI par la méthode d'incorporation	63
III.2.3. Détermination de la concentration minimale d'inhibition Additive (CMIA)	64
III.2.3.1. Addition de l'empois d'amidon au miel.....	65
III.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : Antibiogramme standard	65
III.4. Traitement statistique	65

Résultats et discussion

III. Tests d'activités antimicrobiennes par diffusion en milieu gélosé	67
III.1. Diamètres d'inhibition (mm)	70
❖ Bactéries.....	70
❖ Levures.....	70
III.2. Tests d'activité antimicrobienne par la méthode spectrophotomètre	
(Taux d'inhibition).....	70
❖ Les cocci à Gram positif.....	72
❖ Les bacilles à Gram négatif.....	72
❖ Les levures.....	72

III.3.	Effet additif de l'amidon sur l'activité antimicrobienne du miel.....	72
III.3.1.	Amidon de pomme de terre.....	73
III.3.1.1.	La concentration minimale inhibitrice (CMI).....	73
❖	Pour les bactéries à Gram négatif.....	73
III.3.1.2.	La concentration minimale d'inhibition additive (CMIA).....	73
III.3. 2.	Amidon de Curcuma.....	74
III.3.2.1.	La concentration minimale inhibitrice (CMI).....	75
❖	Effet antibactérien.....	75
❖	Effet antifongique.....	75
III.3.2.2.	La Concentration Minimale Inhibitrice Additive (CMIA).....	75
❖	Effet antibactérien.....	75
❖	Effet antifongique.....	76
III.3.3.	Profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries testées.....	76
	Publication N° 1 (Troisième partie).....	85
	Publication N° 2 (Troisième partie).....	86
	Publication N° 3 (Troisième partie).....	87
	Publication N° 4 (Troisième partie).....	88
	Publication N° 5 (Deuxième partie).....	89
	Publication N° 6 (Troisième partie).....	90
	Publication N° 7 (Troisième partie).....	91
	Publication N° 8 (Troisième partie).....	92
	Publication N° 9 (Troisième partie).....	93
	Publication N° 10 (Troisième partie).....	94
	Publication N° 11 (Troisième partie).....	95
	Publication N° 12 (Troisième partie).....	96
	Conclusion générale et perspectives	97
	Références bibliographiques	99

Résumé

La recherche de produits naturels aux propriétés biologiques est d'une grande importance dans le domaine médical. Dans ce contexte, le miel constitue une source potentielle de ce type de produits. Jusqu'à présent, très peu d'études portant sur la caractérisation du miel Algérien ont été réalisées. Nous avons débuté notre travail par la détermination de l'origine botanique ainsi que la composition physico-chimique de dix (10) échantillons des miels de l'ouest algérien. La quantification des phénols et flavonoïdes totaux a été réalisée en utilisant respectivement la méthode de Folin-Ciocaltheu et celle à l'hydroxyde d'aluminium. L'évaluation des propriétés antioxydantes a été effectuée par deux techniques couramment utilisées : piégeage du radical DPPH et réduction de fer (FRAP). L'activité inhibitrice a été évaluée sur des bactéries (Gram+ et Gram-) et deux levures selon quatre méthodes (Puits, disques, spectrophotomètre et incorporation en gélose). Cette activité a été comparée à celle des antibiotiques de synthèse. Enfin l'effet additif avec l'amidon de pomme de terre et l'amidon de curcuma a été évalué. Parmi les 10 échantillons testés, 4 sont des miels unifloraux et 6 multifloraux. L'analyse méliissopalynologiques a révélé trois miels unifloraux soit, Eucalyptus, Citrus et jujubier, tandis que les miels multifloraux sont à dominance Astéracées et Rhamnacées. Les résultats des paramètres physico-chimiques montrent que tous les miels répondent aux normes internationales. La quantification des phénols et flavonoïdes totaux montre la richesse des miels en polyphénols dont la teneur varie entre $63,93 \pm 0,11$ et $128,87 \pm 0,97$ mg acide gallique équivalent (EAG)/ 100 g miel, et en flavonoïdes exprimées en équivalent catéchine(EC) sont de l'ordre de $5,41 \pm 0,04$ à $21,77 \pm 0,46$ mg EC/ 100g. Tous les miels étudiés se sont avérés dotés des propriétés antioxydantes concluantes. Pour les quatre méthodes utilisées les bactéries Gram + se sont révélées plus sensibles à l'action du miel que les Gram-. Pour ce qui est des levures, *Candida albicans* s'est révélée insensible en regard de deux techniques (disques et puits), alors que cette inhibition était marquée par la méthode du spectre (70,09% -93,48%). *Rhodotorula sp.* s'est montré de légèrement sensible (5,65%) à hautement sensible (99,7%). l'effet additive avec les deux types d'amidon s'est révélé concluant.

Mots clés : Miel/ Algérie/Composition physico-chimique /Effet antioxydant/ Propriétés antimicrobiennes

Abstract

The search for natural products with biological properties is of great importance in the medical field. In this context, honey is a potential source of such products.

So far, very few studies on the characterization of Algerian honey have been performed. We started our work by determining the botanical origin and the physico-chemical composition of ten (10) samples of honeys from western Algeria. Quantification of total flavonoids and total polyphenols was carried out using the Folin-Ciocaltheu and the aluminum chloride methods respectively. Evaluation of antioxidant properties was conducted by two techniques commonly used: DPPH radical scavenging and reduction of iron (FRAP). The inhibitory activity was evaluated on bacteria (Gram + and Gram-) and two yeasts using four methods (well, disc, spectrophotometer and incorporation in agar). This activity was compared to that of synthetic antibiotics. Finally the additive effect with potato starch and turmeric starch was evaluated. Within the 10 samples tested, the méliissopalynologic analysis revealed three unifloral honeys: Eucalyptus, Citrus and jujube, while multifloral honeys are predominantly Asteraceae and Rhamnaceae. The physico-chemical parameters results show that all honeys meet international standards. Quantification of total phenols and flavonoids shows the richness of honey in polyphenols, whose content varies between 63.93 ± 0.11 and 128.87 ± 0.97 mg gallic acid equivalent (EAG) / 100 g honey, and flavonoids expressed in equivalent catechin (EC) are of the order of 5.41 ± 0.04 to 21.77 ± 0.46 mg CE / 100g. All the honeys Studied were found with conclusive antioxidant properties. For the four methods, Gram + bacteria were more sensitive than Gram - bacteria to the action of honey. Regarding yeasts, *Candida albicans* has proved to be insensitive to both techniques (discs and wells), while we noted a marked inhibition by using spectrum method (70.09% -93.48%). *Rhodotorula sp.* proved to be slightly sensitive (5.65%) to highly sensitive (99.7%). the additive effect with the two types of starch was conclusive.

Keywords: *Honey/ Algeria/ Physico-chemical proprieties / Antioxidant activity/Antimicrobial proprieties*

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

1. **Tableau 01:** Composition moyenne du miel.....6
2. **Tableau 02 :** La Durée nécessaire pour la formation de 40 mg HMF/kg de miel en fonction de la Température de stockage.....9
3. **Tableau 03 :** Température de stockage et détérioration des enzymes du miel.....11

Première partie

Résultats & Discussion

1. **Tableau 01:** Appellations des miels et catégories de pollens suivant la densité.....32
2. **Tableau 02:** Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de miel.....35
3. **Tableau 03:** Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de miel (suite).....35
4. **Tableau 04:** Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de miel (suite).....36

Deuxième partie

Résultats & Discussion

1. **Tableau 01 :** Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes totaux des dix échantillons des miels.....49
2. **Tableau 02 :** Effet antioxydant des dix échantillons des miels.....51

Troisième partie

Résultats & Discussion

1. **Tableau 01 :** Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels vis-à-vis de *S. pyogènes*.....67
2. **Tableau 02 :** Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels vis-à-vis de *S.aureus*.....67
3. **Tableau 03 :** Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels vis-à-vis d'*E.coli*.....68

4. Tableau 04 : Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i>	68
5. Tableau 05 : Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels vis-à-vis de <i>C.albicans</i>	69
6. Tableau 6 : Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels vis-à-vis de <i>Rhodotorula sp.</i>	69
7. Tableau 7 : Effet additif de l'amidon de pomme de terre sur l'activité antibactérienne vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> et <i>K.pneumoniae</i>	73
8. Tableau 8 : Effet additif de l'amidon de Curcuma sur l'activité antibactérienne vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> et <i>E.coli</i>	74
9. Tableau 9 : Effet additif de l'amidon de Curcuma sur l'activité antifongique vis-à-vis de <i>C. albicans</i> et <i>R. mucilaginosa</i>	74
10. Tableau 10 : Diamètre de zones d'inhibition en millimètre (mm) des antibiotiques vis-à- vis des germes testés.....	76

Liste des figures

Deuxième partie

Matériel & Méthodes

1. **Figure 1:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....47
2. **Figure 2:** Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....47
3. **Figure 03:** Courbe d'étalonnage du radical DPPH48
4. **Figure 04:** Courbe d'étalonnage de sulfate de fer pour l'activité réductrice du fer48

Résultats & Discussion

5. **Figure 5 :** Corrélation entre l'efficacité antiradicalaire exprimée en % et les teneurs en Polyphénols totaux (A) et les flavonoïdes totaux (B).....56
6. **Figure 6 :** Corrélation entre la réduction de fer exprimée en mg/100 g et les teneurs en Polyphénols totaux (A) et les flavonoïdes totaux (B).....57

Troisième partie

Résultats & Discussion

11. **Figure A :** Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *S.aureus*.....71
12. **Figure B :** Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *S.pyogenes*.....71
13. **Figure C :** Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis d'*E.coli*.....71
14. **Figure D :** Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *P. aeruginosa*...71
15. **Figure E :** Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *C.albicans*.....71
16. **Figure F :** Moyenne des taux inhibitions (%) des miels vis-à-vis de *Rhodotorula sp*.....71

ATP : L'adénosine-5'-triphosphate

a_w : Activité de l'eau.

CA- SFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

EC₅₀ : Concentration efficace médiane

H₂O₂ :Pyroxide d'hydrogène

kDa : kilodalton

pH : potentiel d'hydrogène

rpm : rotation per minute

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction Générale

Le miel, produit par l'abeille mellifère (*Apis mellifera L.*) fait partie des aliments les plus anciens de l'humanité. Il est également connu depuis des millénaires pour ses propriétés thérapeutiques. Longtemps encore utilisé au 20^{ème} siècle, il a été abandonné après la deuxième guerre mondiale peu à peu en faveur de produits plus modernes, plus innovants et ceci malgré l'abondante bibliographie portant sur ses propriétés thérapeutiques et faisant l'unanimité sur son efficacité. Assurément la difficulté de maîtriser la stabilité du miel, denrée périssable, et la difficulté à sélectionner le type de miel *ad hoc* ont conduit l'industrie pharmaceutique à s'en détourner. En Afrique, le miel est un élément très largement consommé. L'Algérie, par sa situation géographique et sa diversité botanique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes mellifères y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années.

Quoique la composition du miel est extrêmement complexe, qualitativement, tous les miels contiennent des composants similaires tels que : sucres, acides organiques, quelques vitamines, protéines, peptides, acides aminés, minéraux, composés phénoliques produits de la réaction de Maillard ainsi que bon nombre d'enzymes tels que : amylases, invertase, catalase et glucose oxydase (Gheldof *et al.*, 2002 ; Bogdanov *et al.*, 2008), sans qu'il soit possible d'obtenir une composition constante. Les propriétés biologiques du miel dépendent largement de ces composants. La concentration et la nature de ces mêmes composants dépendent de son origine géobotanique et conditions climatiques. Il est également important de noter que les concentrations des substances organiques du miel peuvent grandement varier entre des miels de même origine botanique (Yao *et al.*, 2004).

Dans un contexte d'augmentation de la prévalence des microbes résistants voire multirésistants et de la diminution des options thérapeutiques, ainsi que des pathologies liés au stress ou « maladie de la civilisation », la réévaluation d'anciennes pratiques connaît un

regain d'intérêt. Grâce à ses nombreux principes actifs, le miel possède des propriétés biologiques capables de contrebalancer des processus pathologiques tels que le stress et l'infection. Le champ d'application principal du miel dans le domaine médicale se situe dans le traitement des infections bactériennes, fongiques, parasitaires, virales, broncho-pulmonaires, gastro-intestinales diabète et du stress oxydatif. L'usage du miel dans le traitement des brûlures et dans la cicatrisation des plaies de tous types a largement fait ses preuves. Compte tenu de ces propriétés. En utilisant dix échantillons de miels dont l'origine botanique et la concordance avec les normes internationales ont été en premier lieu préalablement vérifiées, nous nous proposons en second lieu de tester leur activité antioxydante en utilisant deux techniques couramment employées: piégeage du radical (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) (DPPH) et réduction de fer (ferric reducing antioxidant power) (FRAP), ainsi que la corrélation éventuelle avec les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux. La troisième partie de notre étude sera axée sur les effets antibactériens et antifongiques de ces miels. Enfin en dernier lieu, nous nous proposons de vérifier une éventuelle activité additive avec l'amidon de pomme de terre et l'amidon de curcumin.

Synthèse bibliographique

I. Le Miel

I.1. Définition

Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Api mellifera* à partir du nectar de plantes ou des excréments laissés sur celles-ci par des insectes suceurs, qu'elles butinent, transforment en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, entreposent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. A l'exception du miel filtré aucun pollen ou constituant propre au miel ne doit être retiré ; sauf si cela est inévitable lors de l'élimination de matières organiques et inorganiques étrangères (Codex alimentarius, 1993).

I.2. Origine du miel

Lorichiche, (1979), affirme que le miel, suc des abeilles butineuses, peut être soit d'origine florale (nectar des fleurs), soit d'origine animale (sécrétion d'insecte).

I.2.1. Le nectar

Le nectar est une substance douce parfumée, forme le principal constituant du miel, donné sous forme de gouttelettes, provenant d'excroissance granulaire des fleurs (nectaire) (Caillas, 1974). Il peut contenir 80% d'eau, 18% à 19 % de sucres, on y trouve également des traces d'acides aminés, des sels minéraux, d'hormones végétales, des pigments et des vitamines (Bogdanov ,1995). D'une façon générale, les abeilles ne visitent pas les fleurs dont la concentration en sucre est inférieure à 10% (Vecchis, 1999 ; Caillas, 1974).

I.2.2. Le miellat

Le miellat provient d'une substance rejetée par les insectes piqueurs et suceurs tels les pucerons qui suce la sève des plantes (Marchenay, 1984). Il est aussi émis à travers les orifices stomatiques des feuilles lorsque l'été est très sec (Biri, 1986). D'après (Bogdanov ,1995), le miel peut être aussi élaboré par les abeilles à partir des autres sucres végétaux à forte teneur en glucides.

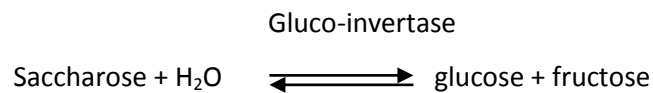
I.3. Elaboration du miel

Pendant le retour à la ruche, la butineuse qui a entièrement rempli son jabot à l'aide de trompe, commence la transformation du nectar ou du miellat, et leur donne son empreinte personnel **Alexander** cite par **Makhloufi, (2003)**.

Sous l'effet d'enzymes particulières, principalement la gluco-invertase, le saccharose qui est le principal substituant sucré du nectar ou du miellat, se transforme au niveau du jabot en glucose, fructose (lévulose) qui sont mieux assimilables et passent rapidement dans le sang.

Les abeilles réussissent non seulement à changer la nature du sucre mais également à abaisser la teneur en eau (**Chauvin, 1968 ; Gonnet, 1982**).

L'intervention biochimique est représentée selon l'équation suivante :



I.4. Variétés du miel

I.4.1. Miels issus du nectar

I.4.1.1. Miel uni floral ou mono floral

Un miel uni floral est un miel naturel produit par les abeilles, provenant principalement d'une seule espèce florale déterminée, tel que le miel de Callune, le miel d'Acacia, le miel d'Eucalyptus et le miel d'Oranger (**Marchenay, 2007**). Ces miels contiennent certains principes de la plante ayant fourni le nectar, qui selon leur origine botanique possède des propriétés thérapeutiques naturel divers (**Huchet et al., 1996 et Gout, 1998**).

D'après **Clement, (2003)**, on ne trouve pratiquement pas de miel provenant d'une seule espèce végétale, sauf si le nombre des grains de pollen atteint 40 à 50% du nombre total du pollen, à ce moment le nom de cette plante est donné au miel.

I.4.1.2. Miel multi floral

Appelés parfois miels toutes fleures, ce sont des miels récoltés à partir de plusieurs espèces de plantes (**Clement, 2003**) et qui proviennent de mélange sans prédominance et donc sans origine florale précise (**Chauvin, 1968**).

I.4.2. Miel issu de miellat

Se sont des miels d'origine forestière, récoltés en été. Leur couleur va du bleu clair ou brun verdâtre à une teinte presque noire (**Caillas, 1974**). Ils sont reconnaissables par leur couleur foncé, généralement verdâtre (**Biri, 1999**).

II. Composition et propriétés des miels

La composition chimique du miel est aussi variable que son aspect extérieur et se sont précisément les divers éléments qu'il possède qui font son secret.

Cette composition varie d'une variété à l'autre, elle est influencée par de nombreux facteurs : la nature du sol et du végétal, le moment et le mode de la récolte, le mode d'extraction et de conservation, la race d'abeille, l'état physiologique de la colonie et surtout le type de nourrissage (**Bogdanov et al., 2006**).

II.1. Les glucides

D'après **Bogdanov (1997)**, les sucres représentent le principal composant du miel qui par leur effet osmotique exerce une action antimicrobienne.

Vannier (1999), rapporte que le miel qui dépend directement de la flore butinée est constituée essentiellement d'une solution de différents sucres soit environ 80%, dont la plus grande partie représente le glucose et le fructose ou (dextrose, lévulose), soit environ 69% de la matière sèche totale du miel (provenant en partie de l'action d'invertase).

Cependant, le rapport de la quantité du fructose (38%) sur la quantité du glucose (31%) est très important, varie de 0,76 à 1,76 environ. Les miels riches en fructose ne sont pas

facilement cristallisés, alors que ceux riches en glucose cristallisent parfois même dans les ruches (Khenfer & Fettall, 2001).

Il est à noter que les miels de fleurs ont une grande teneur en sucres invertis en monosaccharides que les miels de miellat. Alors que les miels de miellat contiennent plus de sucres complexes et de dextrines qui les rendant visqueux (Weiss, 1985).

Tableau 01: Composition moyenne du miel (Bogdanov et al., 2006)

Echantillons	Miel de fleurs		Miel de forêt	
	Moyenne	Min-max	Moyenne	Min-max
Eau	17,2	15-20	16,3	15-20
Monosaccharides				
Fructose	28-40	30-45	31,8	38,2
Glucose	31,32	4-40	26,1	19-32
Disaccharides				
Saccharose	0,7	0,1-4,8	0,5	0,1-4,7
Autres disaccharides				
Trisaccharides	5,0	2-8	4,0	1-6
Mélezitose	<0,1	-	4,0	0,3-22,0
Erlose	0,8	0,5-6	1,0	0,1-6
Autres trisaccharides	0,5	0,5-1	3,0	0,1-6
Polysaccharides non déterminés	3,1	-	10,1	-
Total des sucres	79,7	-	80,5	-
Sels minéraux	0,2	0,1-0,5	0,9	0,6-2
Acides aminés, protéines	0,3	0,2-0,4	0,6	0,4-0,7
Acides	0,5	0,2-0,8	1,1	4,5-6,5
pH	3,9	3,5-4,5	5,2	4,5-6,5

*Toutes les indications sont données en g/100g de miel

II.2. Teneur en eau

Selon **Vannier (1999)**, la teneur en eau du miel est fixée réglementairement à une moyenne de 17%, une variation de 3% seulement est autorisée ; Selon (**Meda et al., 2005**) la teneur en eau des miels varie entre 15 et 20%.

II.3. Les acides

La plupart des miels sont acides, c'est-à-dire que leur pH est inférieur à 7,0. Les miels de fleurs sont certes moins acides que les miels de forêt, leur pH est toutefois plus bas, le miel de forêt étant, semble-t-il, mieux tamponné (**Bogdanov, 2006**).

(**Jeffrey & Echazarreta, 1996**), rapportent que l'acide gluconique est le principal acide du miel provenant d'une grande partie de l'activité du glucose oxydase.

On trouve aussi dans le miel d'autres acides comme l'acide formique, l'acide lactique et l'acide oxalique. La quantité d'acide la plus élevée admise dans la législation de l'UE, la limite est fixée à 50 milliéquivalents. (**Jeffrey & Echazarreta, 1996**).

(**Bogdanov et al., 1995**) signalent que la quantité limitée admise pour les acides s'élève à 40 meq/Kg de miel, elle varie selon l'origine du miel.

II.4. Les lipides

Ils sont pratiquement inexistant dans les miels. Mais on a identifié néanmoins à l'état de trace, des triglycérides, des acides gras de type acides palmitique, oléique et linoléique. (**Gonnet, 1982**). Selon **Philippe (1999)**, le miel contient une faible quantité de lipides principalement l'acide palmitique, oléique et très peu d'acide laurique, myristoléique, stéarique et linoléique.

II.5. Les Protides

Selon **Gonnet (1982)**, les protides du miel sont des colloïdes, des protéines, des acides aminés libres, de peptone, d'albumine, de globuline et de nucléoprotéine. Ces protéines proviennent essentiellement du nectar, des sécrétions d'abeille et de grains des pollens (**Weiss, 1985**).

II.6. Les protéines et acides aminés

Les protéines du miel se composent principalement d'enzymes provenant des sécrétions des abeilles (**Gonnet, 1982**). Les acides aminés présents dans le miel proviennent en partie de la miellée et en partie des sécrétions des abeilles (**Bogdanov et al., 2006**)

La proline est le principal acide aminé provenant des abeilles (**Bogdanov et al., 2006**). Cet acide aminé présent dans tous les miels en quantité appréciable environ 20µg/100g de miel. D'après (**Meda et al., 2005**), les valeurs les plus hautes pour la proline sont typiques pour les miels du miellat.

Il est à noter qu'on peut trouver également dans le miel des traces de choline et d'acétylcholine, qui sont des protéines ayant une importance physiologique, en fixant le glucose dans les organes (**Weiss, 1985**).

II.7. Les sels minéraux et oligo-éléments

Le miel contient un grand nombre de sels minéraux et d'éléments de trace (**Bogdanov et al., 2006**). Les sels minéraux est en moyenne de 0,1 à 0,2% pour les miels de nectar et de 0,5 à 1% pour les miellats, Les sels de potassium présentent à eux seuls près de 50% de la matière minérale (**Louveaux, 1980**).

(**Meda et al., 2005**) affirment la présence d'une corrélation très considérable entre le pH et le contenu cendré.

II.8. Les Vitamines

Le miel est un aliment pauvre en vitamines, Il s'agit essentiellement de vitamines B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9) qui seraient apportées par le pollen (**Bogdanov & Matzke, 2003**), Sa teneur en vitamine dépend de sa teneur en pollen.

II.9. Hydroxyméthyl-Furfural (5-[Hydroxyméthyl]-furane-2-carbaldéhyde; HMF).

Gonnet (1982), affirme que l'hydroxyméthyl- furfural' n'est pas un composant naturel du miel mais on le trouve néanmoins presque toujours à l'état de trace. Il provient d'une dégradation lente du fructose, lequel en milieu acide se décompose. Les miels frais, récoltés après la miellée et provenant de climats tempérés, ne contiennent aucune ou seulement des traces d'HMF (le plus souvent en dessous de 3 mg/kg) (**Hadorn et al., 1962**).

Pendant le stockage, l'HMF se forme plus ou moins rapidement à partir du sucre sous l'influence des acides et en fonction de la valeur pH et de la température du miel (**Vorlova & Elechovska, 2002**).

Dans le cas d'un stockage au chaud et lors de la fonte à des températures plus élevées (50 à 70°C), la teneur en HMF augmente plus rapidement (**Hadorn et al., 1962**).

Deux paramètres entrent en jeu dans la formation d'HMF : la température et la durée de stockage (**Vorlova & Elechovska, 2002**).

D'après (**Vorlova & Elechovska, 2002**), aucune corrélation n'est trouvée entre l'activité des enzymes et le contenu d'HMF.

Tableau 02 : La Durée nécessaire pour la formation de 40 mg HMF/kg de miel en fonction de la Température de stockage selon White et al., (1964), Hadorn et al., (1962); Sancho et al., (1992).

Température (°C)	Durée pour la formation de 40 mg HMF/kg
4	20-80 ans
20	2-4 ans
30	0.5-1 ans
40	1-2 mois
50	5-10 mois
60	1-2 jours
70	6-20 heures

II.10. Enzymes

De nombreuses enzymes se retrouvent dans le miel. Une partie d'entre elles proviennent du nectar ou du miellat et l'autre partie des sucs salivaires, des sécrétions pharyngiennes de l'abeille (**white et al., 1978**).

Les enzymes sont les constituants les plus importants du miel (**Bogdanov et al., 2006**). Elles sont responsables de la conversion du nectar et du miellat en miel, par conséquent l'activité des enzymes participe dans la valeur biologique du miel (**Vorlova & Elechovska, 2002**).

D'après : **Gonnet, (1982)** On trouve principalement :

1. Amylase (α et β) : assure la dégradation des amidons en dextrine puis en maltose.
2. Gluco-invertase : appelée aussi la Diastase, elle provoque la transformation du saccharose.
3. **Gluko-oxydase** : l'origine de la formation d'acide gluconique dans le miel, son hydrolyse du glucose s'accompagne d'un dégagement d'eau oxygénée.

Il a été également décelé dans les miels des traces de catalase, de peroxydase qui limite l'accumulation du peroxyde, ainsi que divers phosphatase (**Gonnet, 1982**).

a) Diastases (α -amylase et β -amylase)

Les diastases sont présentes dans tous les miels frais en quantité variable suivant l'origine du miel (**Philippe, 1999**).

Meda et al., (2005) rapportent que les meilleurs miels contiennent une haute quantité de diastase entre 17,1 et 27,9 mg/kg.

Vorlova & Elechovska (2002) croient que le miel du miellat contient une haute activité de diastase et d'invertase que le miel de fleur.

D'après **Audigie (1980)**, les amylases sont responsables du dédoublement de l'amidon en dextrine et en maltose.

Yilmaz & Küfreviöglu (2001) prouvent que la dégradation de l'amidon est faite par les amylases du miel et ça en hydrolysant 1 ml d'une solution de 1 % d'amidon par 1g du miel après 1 heure de réaction.

b) Invertases

Les invertases (glucoinvertases et fructoinvertases) convertissent le sucrose en fructose et en glucose (**Miraglio et al., 2003**). Elles sont présentes également dans tous les miels frais (**Philippe, 1999**).

Bogdanov (1997) confirme la présence d'une corrélation fortement significative entre les diastases, l'activité des invertases et l'inhibition bactérienne. D'après **Bogdanov (1999)**, l'activité enzymatique diminue en fonction de l'élévation de la température et de la durée de stockage.

Tableau 3 : Température de conservation et détérioration des enzymes du miel par jour White et al. (1964)

Température (°C)	Demi-vie	
	Amylase	Invertase
10	1480 jours	820
20	12600 jours	9600
30	200 jours	83
40	31 jours	9,6
50	5,4 jours	1,3
60	1 jour	4,7
70	5,3 jours	47
80	1,2 jours	8,6

* Durée de demi-vie: durée pour réduire à moitié l'activité enzymatique.

II.11. Les pigments

Les caroténoïdes et les flavonoïdes sont principalement responsables de la coloration du miel. Les flavonoïdes, qui appartiennent aux groupes des polyphénols, possèdent des propriétés anti-oxydantes très intéressantes, car ils participent à la neutralisation des radicaux libres. La quantité et le type de flavonoïdes varient selon la source florale. En règle générale, plus les miels sont foncés, plus ils en sont riches. La pinocembrine, la pinobanskine, la chrysin, la

galangine, la quercétine, la lutéoline et le kaempférol font partie des flavonoïdes contenus dans le miel (**Bonté & Desmoulière, 2013**)

II.12. Microorganismes

❖ Bactéries et les toxines

Les microorganismes qui parviennent dans le miel ne peuvent pas s'y développer **Guiraud, (2003)**, On trouve dans le miel beaucoup moins de bactéries que dans d'autres produits crus de provenance animale **Tysset et al., (1981)**. D'après **Wellford et al., (1978)** les toxines ne peuvent pas se former, étant donné que la forte activité de l'eau empêche la germination et la croissance; les spores par contre peuvent survivre **Vlaven (1995)**.

❖ Les levures

D'après **Tysset et al., (1981)** Le miel contient différentes levures osmotolérantes responsables de la fermentation.

II.13. Cristallisation

La cristallisation du miel est ainsi un processus naturel **Horn (1991)**. La vitesse de cristallisation dépend surtout de la teneur en glucose du miel **White (1962); Bogdanov et al., (1987)**. Les miels dont la teneur en glucose est < 28 g/100 g ou dont le rapport glucose/eau est $< 1,7$ restent plus longtemps liquides. Les miels à cristallisation rapide se cristallisent le plus souvent très finement, alors que les miels à cristallisation lente ont tendance à avoir une cristallisation grossière **White (1962)**.

II.14. Miels toxiques

Il s'agit le plus souvent de miels Provenant de plantes de la famille des *Ericaceae* (**Bogdanov et al., 2004a**), Par opposition à cette donnée de (**Marchenay & Ravazzi ,1996**) explique que même si les abeilles butinent ces plantes le produit final ne comporte pas la moindre contre indication. Les empoisonnements dus à du miel toxique sont en particulier provoqués par la consommation de miel qui contient des substances du groupe des andromédotoxines, Des tutines et des hyénanchines **White (1981)**.

II.14. Altérations du miel

❖ Effets du vieillissement

Pendant le vieillissement, le miel subit lentement un certain nombre de transformations qui sont fonction de sa composition et de la température de conservation. Dans ce cas le miel perd progressivement sa valeur antibactérienne. Donc le miel doit être l'objet de soins attentifs si l'on veut qu'il conserve sa fraîcheur et toute sa qualité gustative (Louveaux, 1985).

Ces transformations sont résumées comme suit :

- La couleur devient rapidement foncée.
- La teneur relative en sucre se modifie, car les sucres simples comme le fructose et le glucose ont tendance à se regrouper pour donner du saccharose, du maltose ou des produits complexes.
- L'acidité augmente.
- L'activité des diastases diminue nettement. L'amylase baisse en moyenne de 3% par mois, mais moins vite à température plus basse.
- L'augmentation régulière et relativement rapide de la teneur en HMF, substance qui se forme à partir du lévulose en milieu acide.
- Les arômes disparaissent et sont remplacés peu à peu par des substances colorées, d'odeur désagréable et de goût amer qui proviennent de transformations biochimiques complexes.

II.15. Fermentation

La fermentation du miel est un phénomène lié à la teneur en eau et à la température et la présence de germes susceptibles de se multiplier au sein de la masse du produit.

La cristallisation aussi est un facteur important de variation de la teneur en eau, car elle aboutit à la formation de deux phases : Une phase solide constituée de glucose cristallisé et une phase liquide enrichie en eau qui constitue un milieu favorable aux développements

des levures osmophiles. La richesse en germes constitue un facteur important pour la fermentation du miel (**Chauvin, 1968**).

III. Propriétés biologiques

1. Propriétés antibactériennes

La première étude sur l'effet antimicrobien du miel a été rapportée par **Van Ketel en 1892** qui a été utilisé comme un remède depuis des périodes antiques dans beaucoup de cultures (**Molan, 1992**). Le miel inhibe la croissance d'un grand nombre des champignons et bactéries (**Bogdanov & Blumer, 2001**). Bien que tous les mécanismes impliqués ne soient pas totalement connus, aujourd'hui quelques facteurs principaux sont décrits :

1.1. pH acide

Le pH du miel est relativement acide, situé entre 3,5 et 6. Même si de nombreuses bactéries sont capables de supporter un pH bas, ce pH semble être efficace pour ralentir ou éviter la croissance de certaines espèces de bactéries. **Molan (2002)** a rapporté aussi que l'éthylacétate est un acide de miel qui est efficace contre les bactéries et les mycètes.

D'après **Jeffrey & Echazarreta (1996)**, les acides organiques libres jouent un rôle dans l'activité antimicrobienne du miel. Ils sont très solubles dans les membranes de la cellule et induisent des altérations dans la perméabilité cellulaire et dans la phosphorylation oxydative pathogènes.

1.2. Osmolarité

Le miel de l'abeille est une solution sucrée concentrée avec une pression osmotique élevée (**Bogdanov et al., 2004**) 84% étant un mélange de fructose et de glucose avec une basse activité de l'eau (a_w) qui varie entre 0,56 à 0,62 (**Molan, 1992**).

D'après (**Guiraud, 2003**), une a_w inférieure à 0,62 bloque tous développements microbiens. **Mescle & Zucca (1996)** expliquent qu'une basse a_w provoque une diminution du volume cytoplasmique (plasmolyse) de la cellule et perturbe les fonctions métaboliques des germes

pathogènes et inhibe totalement leur développement. Les mêmes auteurs rapportent encore que le stress osmotique provoque un effet primaire qu'est la fuite d'eau.

D'après (**Bogdanov & Blumer, 2001**), le miel agit d'une manière osmotique et absorbe l'eau vitale des microorganismes pathogènes. Ce qui provoque la plasmolyse cellulaire puis la mort de la cellule microbienne (**Theunissen et al. 2001**).

Une étude comparative entre le miel et une solution de sucre à une pression osmotique et une activité de l'eau semblables à celle du miel a démontré que l'activité antimicrobienne du miel est particulièrement efficace contre les *Salmonelles*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Penicillium chrysogenum* que la solution de sucre (**Miraglio et al., 2003**).

Molan (1995) affirme que la basse activité de l'eau du miel n'est pas la seule explication pour son activité antimicrobienne.

Bogdanov & Blumer (2001) rapportent aussi que même dans les miels fortement dilués, les inhibines qui s'y trouvent sont efficaces. Par conséquent il doit y avoir encore d'autres substances antimicrobiennes en plus du taux de sucre élevé et de basse activité de l'eau.

1.3. Le système peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est considéré comme la principale inhibine contenue dans le miel (**Bogdanov & Blumer, 2001**). L'eau oxygénée et l'acide gluconique résultent de l'oxydation de l'eau et du glucose. Cette oxydation est provoquée par la glucose oxydase (**Bogdanov & Blumer (2001)**). L'acide gluconique et le peroxyde d'hydrogène résultant de cette réaction préservent et stérilisent le miel (miel non mûr) pendant le processus de maturation (**Molan, 2002**).

Selon (**Bogdanov & Blumer, 2001**), la catalase représente l'antagoniste de la glucose oxydase car elle réduit l'eau oxygénée. La concentration de peroxyde d'hydrogène dépend donc directement de l'activité de ces deux enzymes. Dans le miel mûr la glucose oxydase est

inactive, il contient seulement une petite quantité de peroxyde d'hydrogène non suffisante à empêcher la croissance bactérienne (**Bogdanov, 1997**).

Cependant la dilution du miel augmente l'activité enzymatique de la glucose-oxydase et par conséquent la concentration de l' H_2O_2 s'élève (**Molan, 1992**).

Le peroxyde d'hydrogène donne une protection contre les microorganismes pathogène par un mécanisme biochimique qui interrompt leurs métabolismes et dénature leurs protéines. (**Jeffrey & Echazarreta, 1996; Lusby, 2002**). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est à la fois photo et thermolabile (**Bogdanov & Blumer, 2001**).

L'action du peroxyde d'hydrogène contenu dans le miel sur des bactéries résistantes (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et quatre souches d'*Enterococcus faecium* résistantes à la vancomycine) prélevées dans des plaies infectées a été récemment soulignée (**Brudzynski & Lannigan, 2012**).

1.4. Facteurs phytochimiques

❖ La défensine-1

La défensine-1 est une protéine fabriquée par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des abeilles. Elle est retrouvée dans le miel et la gelée royale. Chez l'homme, les défensines constituent une famille de peptides antimicrobiens naturels largement impliqués dans l'immunité innée. Ce sont des petits peptides, de masse moléculaire variant de 3,5 à 6 kDa, qui possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne. Il a été montré récemment que la grande majorité des propriétés antibactériennes du miel provient de cette protéine (**Kwakman et al., 2010**).

❖ Le méthylglyoxal

Le méthylglyoxal (MGO) est un antibactérien naturel retrouvé en particulier dans le miel de Manuka (*Leptospermum scoparium*).

2. Activité antifongique

La propriété antimicrobienne du miel offre le potentiel de traiter toutes les infections fongiques (**Molan, 2002**). Les résultats démontrent que la croissance a été empêchée par le peroxyde d'hydrogène du miel de pâturage et par l'activité antimicrobienne non-peroxydique du miel Manuka, mais la concentration nécessaire pour empêcher certaines dermatophytes est supérieure à celle qui est nécessaire pour empêcher les bactéries (**Molan, 2002**).

Le miel en concentration allant de 5 à 80% a des effets inhibiteurs contre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* et *Trichosporon spp.* Cet effet contre les levures s'avère néanmoins moins intéressant que ceux de la propolis et du pollen (**Koç et al., 2011 ; Al-Waili 2005a**).

Whadan (1998) a montré une action inhibitrice sur *Aspergillus niger* et *Trichophyton mentagrophytes*, à des concentrations supérieures à celles nécessaires pour des bactéries. Une autre étude menée en 2003 par Al-Waili, des patients souffrant de psoriasis et de dermatite atopique ont été traités grâce à une mixture composée en quantités égales de miel, de cire d'abeille et d'huile d'olive. Il a montré que le miel réduit les oedèmes, les exsudats ainsi que les douleurs engendrés par les lésions cutanées.

La vulvo-vaginite à *Candida* est traitable par le miel. Sont des recherches qui ont été confirmées par l'utilisation des distillats du miel sur des isolats cliniques qui démontre que les distillats du miel étaient comparables aux antifongiques dans leur capacité à empêcher *Candida albicans* (**Miraglio et al., (2003)**).

3. Les propriétés cicatrisantes du miel

De nombreux travaux scientifiques démontrent que le miel présente des activités spécifiques favorisant les différentes phases nécessaires à la cicatrisation.

Le miel a été utilisé pour la première fois chez une jeune fille de 20 ans qui avait subi une résection importante de l'intestin grêle. Suite au drainage d'un abcès de paroi important, la patiente présentait une perte de substance au niveau de la partie centrale de sa plaie

abdominale. Une application de miel au niveau de cette cavité a conduit en huit jours à une cicatrisation pratiquement complète.

Des cas clinique ont aussi été obtenus chez des animaux. Des vétérinaires (**Khiati et al., 2013b**) ont traité avec du miel une jument arabe âgée d'un an et demi qui présentait une plaie infectée suintantes et malodorantes. Au bout d'une semaine, la mauvaise odeur et les suppurations ont disparu. En un mois, le bourgeonnement conjonctif comblait complètement la plaie. Au bout de un mois et demi, la cicatrisation était totale.

D'après **Orsolic et al., (2003)** le miel est un remède naturel très ancien, utilisé pour le traitement des blessures il a pour effet un recul rapide de l'oedème (accumulation d'eau dans les tissus), il stimule la formation de nouveaux tissus conjonctifs et nettoie la plaie des cellules mortes.

Grâce aux différentes investigations et pratiques opérées à Limoges ainsi qu'à Cuba et Cremona en Italie, le miel a démontré son activité cicatrisante et également ses propriétés nettoyantes, désinfectantes. Des brûlures cutanées ou des plaies recouvertes d'un pansement occlusif pourraient provoquer des surinfections aspergilloses, le miel est utilisé comme alternative au antifongique par leur action sur ces infections (**Bacha, 2003**).

Une recherche sur deux types du miel, l'un de pâturage avec une activité antimicrobienne due au peroxyde d'hydrogène et l'autre de Manuka qui est riche en substances antimicrobiennes non-peroxydiques ont été étudiés pour tester leurs propriétés antifongiques contre des isolats cliniques de sept espèces fongiques de groupe dermatophytes (**Molan, 2002**).

Les résultats démontrent que la croissance a été empêchée par le peroxyde d'hydrogène du miel de pâturage et par l'activité antimicrobienne non-peroxydique du miel Manuka, mais la concentration nécessaire pour empêcher certaines dermatophytes est supérieure à celle qui est nécessaire pour empêcher les bactéries (**Molan, 2002**).

Willis cité par **Bacha (2003)** a conclu en fin de ses études que le traitement local par le miel une fois par semaine peut atténuer les symptômes de la dermatite séborrhéiques, s'est avéré efficace. D'après **AL Waili, et al., (2004)** le miel réduit les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires dans le sang comme: lipoprotéines "low density", protéines C-reactives et cholestérol dans le sang; et réduit le risque d'artériosclérose; comme il Réduit la concentration en prostaglandine dans le sang et agit de façon anti-inflammatoire (**Haffejee & Moosa, 1985**). Le miel réduit le risque de cancer, Comme il agit de façon anti-mutagène et anti-cancérigène **Watanabe et al., (1996)** ; **Orsolich et al., (2003)**. Chez des souris et des rats, l'administration orale et quotidienne de miel durant les 10 jours avant l'inoculation de cellules cancéreuses de carcinome mammaire et colique a permis d'inhiber la formation de métastases avec des doses de 2 g/kg pour les souris et 1 g/kg pour les rats (**Orsolich et al., 2003**).

Le miel a été employé depuis des périodes antiques dans le traitement des maladies de l'œil. **Molan (2001)**. Dans le traitement des blépharites (inflammation des paupières), conjonctivite catarrhale, kératites (inflammation de la cornée) et divers dommages comme des brûlures chimiques ou thermiques qui touchent la cornée de l'œil.

Le miel Inhibe la croissance d'*Helicobacter pilori*, qui provoque des ulcères à l'estomac et dans le duodénum de même que des gastrites. Dans le cas de ces maladies, l'utilisation de miel de façon préventive a fait ses preuves (**Ali, 1997**).

Le miel Stimule dans l'estomac la croissance des bactéries utiles du type *Bifidus* **Kajiwara et al.,2002** aide dans le cas d'une gastro-entérite d'origine bactérienne (diarrhée) chez les enfants (**Haffejee & Moosa, 1985**).

Belostotskiï et al., (2009) ont montré que des administrations par voie orale de miel avaient des effets gastroprotecteurs sur les estomacs ulcérés de rat (ulcères induits à l'acide acétique à 100%). A 7 jours après ulcération (date d'euthanasie des rats et d'analyse des estomacs), les muqueuses sont en voie de cicatrisation et la sécrétion de sucs gastriques acides diminuée.

Le miel peut effectivement provoquer des caries **Bowen & Lawrence (2005)**. Selon un rapport, le miel provoquerait toutefois moins de caries que le saccharose. Les miels avec une action antibactérienne élevée, par exemple le miel de manuka, provoquent moins de caries **Edgar & Jenkins, (1974)**. Selon d'autres rapports, le miel inhibe la croissance des bactéries à l'origine des caries **Sela et al., (1998)**. *In-vitro*, **Zeina et al., (1996)** ont montré une action du miel sur le virus de la rubéole. De même, *in-vivo*, le miel utilisé dans l'étude de **Al-Waili (2004)** a révélé une activité antivirale supérieure à celle de l'acyclovir[®] sur des lésions dues au virus de l'herpès simplex labial et génital (types 1 et 2) chez l'homme.

Le miel en diverses solutions a montré des effets inhibiteurs *in-vitro* sur le protozoaire *Leishmania sp.* Cet effet est supérieur à celui créé par une solution de sucre classique (**Zeina et al., 1997**).

4. Propriétés antioxydante

L'oxygène est un gaz essentiel à la vie, il est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries. Il est nécessaire pour la production d'énergie dans les cellules eucaryotes en participant au transport des électrons dans la chaîne respiratoire des mitochondries. Un autre rôle essentiel de ce gaz est son utilisation dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) que les polymorphonucléaires (PMN), comme les neutrophiles, synthétisent en vue de combattre les structures exogènes. Néanmoins, les effets largement bénéfiques de ce gaz et de ces dérivés n'occulent en rien sa toxicité, car le dysfonctionnement de ces systèmes est à l'origine des phénomènes de stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée). Quand les défenses naturelles de l'organisme (d'origine enzymatique, non enzymatique ou alimentaires) sont submergés par une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), une situation de «stress oxydatif» survient, dans lequel les macromolécules cellulaires et extracellulaires (protéines, lipides et des acides nucléiques) peuvent subir des dommages oxydatifs, provoquant des lésions tissulaires (**Halliwell & Gutteridge, 1989 ; Halliwell & Aruoma, 1991**).

Les biomarqueurs des ERO ont été impliqués, par des études cliniques et épidémiologiques, dans de nombreuses maladies comme le diabète, les maladies respiratoires, les cancers, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, les ischémies reperfusion, l'inflammation, l'arthrite rhumatoïde, l'endométriose,... **(Radak et al., 2008ab, Wactawski-Wende et al., 2009, Hempel et al., 2009).**

La consommation d'aliments ayant une activité antioxydante naturellement est le moyen le plus efficace de lutter contre ces lésions des tissus, les transformations désirées et la prévention des risques pour la santé. Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires **(Sanchez-Moreno, 2002 ; Huang et al., 2005).**

L'intérêt pour les antioxydants naturels est déterminé par l'universalité de leurs actions dans divers systèmes redox et par conséquent un large spectre d'applications possibles. Les antioxydants phyto-chimiques sont considérés comme des ingrédients fonctionnels pour les produits pharmaceutiques, les aliments et compléments alimentaires, aliments pour animaux, cosmétiques et autres produits **(Augustyniak et al., 2010).**

Bon nombre d'études ont abouti à l'identification de nouveaux composés naturels et la sélection des espèces prometteuses en termes de leur utilisation prévue pour l'isolement des constituants bioactifs.

Parmi ces derniers les produits de la ruche, et -en particulier le miel- occupent une place de choix. Le miel a été utilisé en ethnomédecine depuis des temps immémoriaux, et dans une époque plus récente son rôle dans le traitement des brûlures, troubles gastro-intestinaux, l'asthme, les plaies infectées et chroniques, ulcères de la peau, cataractes et autres affections

oculaires, pour ne citer que ceux-là, a été « redécouvert » (**Castaldo & Capasso, 2002; Marcucci, 1995; Molan, 1992**). Ce rôle bénéfique est partiellement attribuable à son activité antibactérienne. Cependant, du fait que certaines de ces maladies sont une conséquence des dommages oxydatifs, il semblerait qu'une partie des propriétés thérapeutiques du miel est due à sa capacité antioxydante.

Le miel, comme source d'antioxydants, a été largement prouvée par différents auteurs (**Beretta et al., 2005 ; Nagai et al., 2006 ; Ferreira et al., 2009**).

D'après certaines recherches *in vivo*, le miel, comme d'autres agents anti-oxydants, protège contre bon nombre de dommages. Cet effet protecteur de miel est en partie médiée par l'amélioration du stress oxydatif dans les tissus tels que le tractus gastro-intestinal, le foie, les reins, le pancréas, les yeux, le plasma, les globules rouges et les organes reproducteurs (**Al-Waili et al., 2006 ; Kassim et al., 2010**)

Cette capacité du miel est due à des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques incluant glucose oxydase, catalase, peroxydase, acide ascorbique, dérivées caroténoïdes, acides organiques, acides aminés et protéines, produits de la réaction de Maillard et plus de 150 composés polyphénoliques comprenant les flavonoïdes et acides phénoliques. Les miels sombres présentent une activité antioxydante plus élevée que les miels clairs (**Frankel et al., 1998 ; Taormina et al., 2001; Aljadi & Kamaruddin, 2004 ; Bertonecelj et al., 2007 ; Vela et al., 2007**)

Le miel est riche en polyphénols (flavonoïdes et acides phénoliques), lesquels agissent comme antioxydants naturels. Ces composés font l'objet d'un intérêt croissant en raison de leur rôle potentiel contribuant à la santé humaine. (**Gheldof & Engeseth, 2002; Gheldof et al., 2002; Aljadi & Kamaruddin, 2004; Beretta et al., 2005; Estevinho et al., 2008**)

Les variations dans l'activité antioxydante des miels pourraient être dues en partie à la nature qualitative et quantitative des polyphénols qui y sont présents. Ces derniers en retour sont

étroitement dépendants de l'origine botanique. La raison est que la structure de ces composés phytochimiques joue un rôle important dans la détermination de l'activité antioxydante (**Heim et al., 2002**). Plus le miel est sombre et plus élevé est sa teneur en polyphénols ainsi que son pouvoir antioxydant (**Vela et al., 2007**). Bon nombre d'études ont abouti à l'identification de nouveaux composés naturels et la sélection des espèces botaniques prometteuses en termes de leur utilisation prévue pour l'isolement des constituants bioactifs. (**Augustyniak et al., 2010**). Cependant cela ne semble pas être le cas pour le miel, en effet, sa teneur de composés phénoliques n'est pas toujours positivement proportionnelle à son activité antioxydante (**Al-Mamary et al., 2002**). Les flavonoïdes ou polyphénols testés seuls dans des systèmes in vitro, ne reflètent nullement l'activité antioxydante totale du miel (**Gheldof et al., 2002**). Ainsi, le consensus général est que ces composés sont impliqués, mais ne sont pas entièrement responsable de cette activité, impliquant ainsi un effet synergique.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro et in vivo, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (**Ricardo da Silva et al., 1991**) ; les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (**Benzie & Strain, 1996**); ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (**Re et al., 1999**), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle) (**Sharma & Bhat, 2009**).

Première partie

Origine botanique

&

Propriétés physico-chimiques

Introduction

Le miel est un mélange éminemment complexe et aucun miel n'est totalement identique à un autre. Sa composition, de même que ses différents effets biologiques varient dans une large mesure, - mais pas complètement-, en fonction du nectar et / ou du miellat provenant des espèces végétales butinées par les abeilles (origine botanique). Il faut être prudent dans l'application, de pays à pays, des gammes caractéristiques des miels monofloraux. En raison de la variation de l'origine végétale, le miel diffère en l'apparence, la perception sensorielle, et la composition (**Bogdanov et al., 2008**). Il existe trois types de miels en ce qui concerne leur origine : miel de nectar fait à partir du nectar des plantes, miel de miellat (fait principalement de la sécrétion d'insectes se nourrissant de jus végétaux ou de sécrétion de plantes), et le miel mixte (miellat et nectar). La composition de miels de même origine florale peut être très différente en fonction de plusieurs facteurs, tels la zone géographique (caractéristiques du sol et du climat), la saison, les espèces d'abeilles, de la technologie et du mode de récolte et de stockage (**Bogdanov, 2009**).

Traditionnellement, l'origine botanique du miel a été déterminée dans de nombreux laboratoires par l'analyse du pollen, méthode appelée méliissopalynologie. Cette méthode méliissopalynologique, qui a été élaboré et proposé par la Commission internationale de Botanique apicole en 1970 (**Louveaux et al., 1970**), puis révisé et mis à jour en 1978 (**Louveaux et al., 1978**), est fréquemment utilisé jusqu'à l'époque actuelle. En outre, dans la directive du Conseil de l'UE (2002) relative au miel, il est indiqué que les noms de produits peuvent être complétées par des indications ayant trait à l'origine florale ou végétale, si le produit provient entièrement ou essentiellement de l'origine indiquée et en possède les caractéristiques organoleptiques, physico-chimiques, et les caractéristiques microscopiques de la source (**Kaškonien et Venskutonis 2010**).

Toutes les données qui vont être traitées dans cette partie de notre étude, proviennent d'un laboratoire Belge spécialisé dans l'analyse de la composition du miel, disposant d'une

collection de référence conséquente de grains de pollens, qui associé aux caractères physico-chimiques et sensoriels ont permis d'établir l'origine botanique et la conformité de nos miels aux standards internationaux. Vu la multiplicité des données et pour une meilleure compréhension, nous allons raisonner par moyennes sauf pour les particularités qui méritent d'être relevées. Il convient également de noter que notre présente étude n'a pas pour but de faire connaître, la flore mellifère, car l'échantillon ne s'y prête pas, mais seulement l'origine botanique, la composition des miels et surtout leur conformité en regard de la législation en vigueur et ce, pour étayer les résultats des études qui vont suivre.

Matériel & Méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Echantillons de miel

Notre étude a porté sur 10 échantillons de miels récoltés la même année (2011) et provenant de quatre wilayas limitrophes du nord Algérien à savoir : Tiaret (échantillons M5, M6, M7, M8 et M10), Saida (échantillon M2), Relizane (échantillons M1et M9) et Mascara (échantillons M3 et M4). Ces différents échantillons ont été conservés dans des flacons en verre stériles, hermétiquement fermés, étiquetés, datés, et gardés à température ambiante , jusqu'à analyse.

I.2. Origine botanique (Mélessopalynologie)

I.2.1. Principes

L'examen au microscope du miel permet d'en préciser l'origine florale. Il permet également de faire des constatations sur l'éventuelle souillure du miel par des particules insolubles ainsi que sur la quantité de levures présentes. La méthode de l'analyse pollinique consiste à séparer les grains de pollen de la matière qui les entoure afin de pouvoir en observer la morphologie sur une lame microscopique.

I.2.2. Techniques

L'extraction du pollen présent dans le miel est basée sur la différence de densité entre le pollen et le miel dilué.

I.2.3. Méthode par acétolyse

La méthode de l'acétolyse permet l'étude précise de la morphologie pour l'identification des grains de pollen. Elle permet une observation fine et rigoureuse de la structure de la paroi pollinique, élément qui devient indispensable dans le cas des régions où la flore mellifère est mal connue. En revanche, elle détruit les éléments accessoires des miels tels que levures, spores et algues utiles pour déterminer si un miel a fermenté ou contient du miellat. Par conséquent, on la préférera pour l'étude des pollens exotiques, mais pas pour une analyse de

miel en routine. Cette méthode a été réalisée selon la méthode établie par la Commission de botanique apicole et décrite par (**Erdtman, 1969**).

Dix grammes de miel sont pesés et dissous dans 20 ml d'eau chaude ne dépassant pas 40 °C. La solution est centrifugée pendant 10 minutes à 3500 tours-minute et le liquide surnageant est jeté de façon à ne conserver que le culot de centrifugation. Ce culot est ensuite mélangé à 10 ml d'acide acétique avant d'être centrifugé à nouveau 10 minutes à 3500 tours-minute. Le surnageant est éliminé. Un mélange de 9 volumes d'anhydride acétique pour 1 volume d'acide sulfurique est versé au goutte à goutte. 2 ml de ce mélange sont versés sur le culot. Le tout est porté au bain marie à 100°C pendant 1 minute. L'acétolyse est ensuite bloquée en remplissant le tube avec de l'acide acétique. Trois centrifugations avec rinçage à l'eau distillée seront réalisées, avant de monter le culot entre lame et lamelle.

L'identification des grains de pollen a été établie grâce aux banques de données numériques et bibliographiques du laboratoire d'analyse et d'écologie apicole du Centre d'études techniques apicole de Moselle (CARI ASBL) en Louvain-la-Neuve.

I.2.4. Interprétation des résultats

La densité relative est exprimée par le quotient en pourcentage de la densité absolue d'un type de pollen sur la somme des densités absolues de tous les types de pollen du dit échantillon. Elle est calculée pour chaque échantillon de miel qui compte au moins 1200 grains de pollens. L'appréciation est faite suivant la méthode **d'Erdtman (1969)** qui distinguent :

- les pollens dominants ($\geq 45 \%$)
- les pollens d'accompagnement (10-40%)
- les pollens isolés ($< 10\%$)

I.3. Analyses physico-chimiques

Les principaux paramètres de qualité sont la coloration, l'humidité, la conductivité électrique, le pH et l'acidité, le spectre de sucres, la teneur en hydroxyméthylfurfural (HMF), l'activité de l'amylase également appelé indice diastasique et l'activité de l'invertase (**Bogdanov et al. 1997**)

I.3.1. Teneur en eau

La teneur en eau est déterminée par la mesure de l'indice de réfraction à 20 °C à l'aide d'un réfractomètre de type Abbé. Les indices de réfraction sont convertis selon la table de Chataway (**annexe**) en teneur en eau selon la méthode harmonisée du miel développée par la Commission internationale du miel (**Bogdanov, 2002**).

I.3.2. pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre de type HI 9025 – HANNA sur une solution de miel à 10 % dans l'eau distillée Leur teneur en eau est déterminée par la mesure de l'indice de réfraction à 20 °C à l'aide d'un réfractomètre de type Abbé (RF 490, Euromexholland). Les indices de réfraction sont convertis selon la table de Chataway (**Annexe**) en teneur en eau selon la méthode harmonisée du miel développée par la Commission internationale du miel (**Bogdanov, 2002**).

I.3.3. Conductivité électrique

La conductivité électrique au 1/5 a été déterminée selon la méthode de **Bogdanov (2002)** en utilisant un conductimètre de type Knick model. Les mesures sont effectuées à 20 °C dans une solution aqueuse à 20 % par rapport à la matière sèche du miel. La lecture est faite directement après immersion de la cellule dans la solution. Les résultats sont exprimés en milli Siemens par centimètre (mS/cm).

I.3.4. Détermination de l'acidité

L'acidité totale est la somme de l'acidité libre et de l'acidité liée (des lactones) ; elle est exprimée en milliéquivalents d'acide pour 1 000 g de miel. Le matériel utilisé lors de ce dosage est un titrateur automatique de type ORION.

Pour déterminer l'acidité, on utilise la méthode préconisée par l'A.O.A.C n° 31-168 (A.O.A.C, 1976).

- Dissoudre 10 g de miel dans 75 ml d'eau distillée dans un bêcher de 250 ml;
- Mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique;
- Après étalonnage du pH mètre, prolonger l'électrode dans la solution;
- Titrer avec NaOH (0,05 N) à une vitesse de 5 ml/mn;
- Arrêter l'ajout de NaOH à pH 8,5;
- Ajouter immédiatement à l'aide d'une pipette 10ml de NaOH (0,05 N) et faire un dosage en retour à l'aide d'HCl (0,05 N) jusqu'à pH 8,3;
- Faire un essai à blanc (sans miel) dans les mêmes conditions sans dosage en retour;

Les résultats sont exprimés par les formules suivantes :

$$(\text{Chute de burette NaOH (ml)} - \text{Volume versée de NaOH pour blanc}) \times 50$$

$$\text{Acidité libre} = \frac{\text{Prise d'essai (g)}}{\text{Prise d'essai (g)}}$$

.3.5. Activité de l'invertase (Indice de saccharase)

L'activité de l'invertase s'exprime en gramme de saccharose hydrolysé par heure, dans les conditions du test, pour 100 g de miel. L'activité de l'invertase a été déterminée par la méthode de **Siegenthaler (1977)**, basée sur la mesure par spectrophotométrie de la

décomposition du p-nitrophényl-alpha-D-glucopyrinoside (p-NPG) en p-nitrophénol, à 400 nm. Les résultats sont exprimés en unités d'enzyme par kilogramme (U/kg).

I.3.6. Hydroxy-Méthyl-Furfural (HMF)

L'Hydroxyméthylfurfural (HMF) a été mesurée par la méthode Winkler, méthode harmonisée de la Commission européenne du miel décrite par **Bogdanov et al., (1997)** dont le principe est fondé sur l'absorption dans le visible à 550 nm de la coloration obtenue après addition de p-toluidine et d'acide barbiturique à une solution de miel à 20 %. Les résultats obtenus sont exprimés en mg/kg. L'analyse a été effectuée en utilisant un spectrophotomètre UV-visible Cary 50.

I.3.7. Activité de la diastase

L'activité diastasique a été déterminée par la méthode Phadebas, méthode harmonisée de la Commission européenne (**Bogdanov et al., 1997**). Cette méthode consiste en la mesure de la coloration bleue de l'amidon restant suite à une hydrolyse par la diastase à 40 °C (bain thermostatique). Cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 620 nm (spectrophotomètre UV-visible Cary 50). L'absorbance de la solution est directement proportionnelle à l'activité diastasique de l'échantillon de miel. Les résultats sont exprimés en unités de Schade par gramme de miel.

I.3.8. Spectre des sucres

Le dosage des sucres est réalisé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à détection ampérométrique pulsée, selon la méthode de **Bogdanov et al., (1997)** en utilisant un chromatographe avec détecteur Coulochem équipé d'un module de dégazage(Hélium), d'une colonne Carbopac-AS6 (250x4 mm), d'une boucle d'injection de 25 µl et d'un détecteur ampérométrique pulsé avec électrode de mesure en or et d'un intégrateur (**Shimadzu C-R5A Chromatopac**). Le débit est de 0,5 mL/min pendant 16 min, puis 0,1 mL/min pendant 5 min, ensuite 1 mL/min pendant 16 min. De plus, le dosage des sucres et les rapports glucose/eau et

fructose/glucose sont nécessaires pour préciser le potentiel de cristallisation du miel
(Deschamps, 1998).

Résultats & Discussion

II. Résultats

I.1. Origine botanique

Tableau 01: Appellations des miels et catégories de pollens suivant la densité				
Echantillons	Densité générale	Pollens dominants $\geq 45\%$	Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	Pollens isolés < 10%
M1	Forte	-	Fabacée (24%), Apiacées (33%), Brassicacées (35%)	Plantain, Renoncule, Rhamnacées, Cistacée, Ronces, Astéracées
M2	Moyenne	Apiacées (48%) Jujubier	Ronces (15%), Brassicacées (16%)	Renoncule, Astéracées, Lamiacées, Trèfle, Cistacée, Rosacées, Fabacée
M3	Moyenne	-	Rosacées (13%), Fabacée (23%), Apiacées (24%)	Chénopodiacées, Convolvulacées, Lamiacées, Malvacées, Plantain, Poacées, Viperines, Eucalyptus, Renoncule, Cistacée, Rhamacées, Ronces, Brassicacées, Astéracées
M4	Moyenne	-	Apiacées (12%), Lotier (14%), Fabacée (17%), Brassicacées (18%), Orangers (22%)	Chénopodiacées, Poacées, Acacia, Eucalyptus, Lamiacées, Renoncule, Ronces, Rosacées, Cistacée, Plantain, Astéracées
M5	Forte	Eucalyptus (81%)	Apiacées (13%)	Fabacée, Astéracées, Brassicacées
M6	Moyenne	Astéracées (41%)	Fabacée (31%)	Rhamacées, Eucalyptus, Rosacées, Renoncule, Ronces, Apiacées, Brassicacées, Lotier
M7	Forte	Rhamnacées (47%)	Astéracées (17%), Eucalyptus (18%)	Lamiacées, Lotier, Vesce, Ronces, Brassicacées, Rosacées, Apiacées, Fabacée
M8	Forte	Eucalyptus (87%)	-	Plantain, Renoncule, Viperine, Apiacées, Brassicacées, Cistacée, Citrus, Ronces, Fabacée, Astéracées, Rosacées
M9	Moyenne	Oranger	Astéracées (13%), Apiacées (23%), Brassicacées (25%), Oranger (27%)	Acacia, Rosacées, Cistacée, Lamiacées, Renoncule, Ronces, Fabacée, Eucalyptus
M10	Moyenne	Astéracées (62%)	Rosacées (11%), Brassicacées (16%)	Lamiacées, Vesce, Apiacées, Chénopodiacées, Eucalyptus, Fabacée, Ronces

Pollens dominants (>45 %) ; pollens d'accompagnement (16-45 %) ; pollens isolés importants (4-16 %) ; pollens isolés (<3%).

Le **tableau 1** met en évidence trois types de miel monofloraux, à savoir du miel de Jujubier (échantillon M2), d'oranger (échantillon M9) ; des miels d'Eucalyptus (échantillons M5, et M8), et les miels multifloraux (échantillons M1, M3, M4, M6, M7 et M10),

I.2. Analyses physico-chimiques

* Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions \pm écart type.

Les résultats des analyses physicochimiques sont résumés aux **tableaux 2,3 et 4**

I.2.1. Teneurs en eau

Les teneurs en eau des miels analysés ont varié de $13,76 \pm 0,2$ (M3) à $18,05 \pm 0,2$ (M1) %. La norme **Codex Alimentarius (1993)**, fixe une teneur en eau maximale à 21 g/100 g de miel. Ces résultats sont concordent à ceux de **Makhloufi et al., 2010, d'Ouchemoukh et al., (2007)**, qui ont trouvé des teneurs en eau des miels Algérien conformes à la norme européenne.

I.2.2. pH et Acidité libre

Les valeurs du pH sont comprises entre 3.7 ± 0.2 (M6) et 5.0 ± 0.2 (M1) avec une moyenne de 4.17 ce qui veut dire que tous les miels étudiés sont acides. Qu'elles sont situées dans la fourchette de la norme internationale (3.2 à 5.5) (**Cervantès et al., 2000**).

Ces valeurs correspondent à ceux rapportées par **Makhloufi et al., 2010 et Chakir et al., 2011**.

La norme européenne pour le miel fixe une valeur maximale de 50 milliéquivalents d'acide. Nos échantillons présentent une faible acidité libre comprise entre 8.3 ± 1.05 (M7) meq/kg et 26.1 ± 1.05 (M1) meq/kg.

I.2.3. Conductivité électrique

Selon la norme européenne sur le miel, les miels de miellat doivent atteindre 0,8 mS/cm. Le miel de fleurs a généralement tout au plus une valeur CE de 0,5 mS/cm et le mélange de miel de fleurs et de miellat présente des valeurs CE entre 0,5 et 0,8 mS/cm.

Les miels des régions étudiées présentent des conductivités électriques variant entre 0,20 mS/cm \pm 0,01 (M9) et 1.52mS/cm \pm 0,01 (M1).

I.2.4. Indice de saccharase, Activité diastasique et teneur en HMF

L'indice de saccharase n'est pas actuellement inclus dans les standards internationaux de qualité du miel, bien que la saccharase soit considérée comme un meilleur indicateur de fraîcheur du miel que l'activité diastasique, en raison de sa plus grande sensibilité aux traitements thermiques (**Persano Oddo et al., 1999**). Les miels des régions étudiées présentent une activité saccharase variant entre 3,2 \pm 1,9 (M6) et 19,6 \pm 1,9 (M1). Il a été proposé de donner un indice d'invertase supérieur à 10 aux miels frais et non chauffés. (**annexe**)

L'activité diastasique des échantillons de miel étudiés varie entre 7.3 unités de Schade/g \pm 2.8 et 26 unités de Schade/g \pm 2.8. Nous sommes en présence de miels frais, de qualité conformes aux normes.

Selon la législation européenne, le taux d'HMF ne doit pas dépasser 40mg/kg pour le miel destiné à la consommation. Les valeurs de la teneur en HMF de nos échantillons analysés sont comprises entre 3.8 (M10) et 78.4(M2) mg/kg avec une moyenne de 18.82 mg/kg.

Tableau 02: Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de miel

Echantillons	Teneurs en eau (%)	pH	Acidité totale (mequiv./kg miel)	Conductivité électrique (mS/cm)
M1	18.05 ± 0.2	5.0 ± 0.2	26.1 ± 1.05	1.52 ± 0.01
M2	16.04 ± 0.2	4.1 ± 0.2	17.3 ± 1.05	0.52 ± 0.01
M3	13.76 ± 0.2	4.1 ± 0.2	15.2 ± 1.05	0.47 ± 0.01
M4	17.04 ± 0.2	3.9 ± 0.2	10.2 ± 1.05	0.23 ± 0.01
M5	16.14 ± 0.2	4.1 ± 0.2	15.6 ± 1.05	0.57 ± 0.01
M6	15.87 ± 0.2	3.7 ± 0.2	17 ± 1.05	0.27 ± 0.01
M7	14.87 ± 0.2	4.6 ± 0.2	8.3 ± 1.05	0.51 ± 0.01
M8	14.68 ± 0.2	4.0 ± 0.2	11.3 ± 1.05	0.38 ± 0.01
M9	16.30 ± 0.2	4.0 ± 0.2	9.9 ± 1.05	0.20 ± 0.01
M10	16.24 ± 0.2	4.2 ± 0.2	9.7 ± 1.05	0.28 ± 0.01
Normes	≤ 20	3,3 – 4,6	≤ 40	≤ 0,80

Tableau 03: Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de miel (suite)

Echantillons	Invertase	Activité diastasique (Gothe scale)	HMF (mg/kg)
M1	19.6 ± 1.9	25.3 ± 2.8	6,5 ± 1,9
M2	ND	15.1 ± 2.8	78.4 ± 1.9
M3	6.5 ± 1.9	23.5 ± 2.8	28.2 ± 1.9
M4	4.3 ± 1.9	7.6 ± 2.8	11.8 ± 1.9
M5	12.6 ± 1.9	26.2 ± 2.8	9.6 ± 1.9
M6	3.2 ± 1.9	16 ± 2.8	21.4 ± 1.9
M7	ND	11 ± 2.8	11.1 ± 1.9
M8	ND	26 ± 2.8	9.8 ± 1.9
M9	ND	7.3 ± 2.8	7.6 ± 1.9
M10	4.6 ± 1.9	16.4 ± 2.8	3.8 ± 1.9
Normes	-	≥ 8	≤ 40

ND : non détecté ; mEq : milli équivalent ; (mS/cm) :

Tableau 04: Résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de miel
(suite)

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Fructose	25,20 ± 3,32	35,29 ± 3,32	37,81 ± 3,32	37,64 ± 3,32	37,15 ± 3,32	36,77 ± 3,32	33,92 ± 3,32	36,84 ± 3,32	35,41 ± 3,32	35,18 ± 3,32
Glucose	21,45 ± 2,14	26,37 ± 2,14	26,18 ± 2,14	28,26 ± 2,14	26,39 ± 2,14	21,61 ± 2,14	25,78 ± 2,14	28,84 ± 2,14	27,24 ± 2,14	30,95 ± 2,14
Maltose	0,00 ± 1,32	5,81 ± 1,32	7,13 ± 1,32	3,54 ± 1,32	5,79 ± 1,32	7,02 ± 1,32	8,45 ± 1,32	7,01 ± 1,32	4,72 ± 1,32	7,10 ± 1,32
Turanose	8,83 ± 0,64	1,30 ± 0,64	1,98 ± 0,64	1,61 ± 0,64	1,66 ± 0,64	2,00 ± 0,64	2,23 ± 0,64	2,13 ± 0,64	1,30 ± 0,64	0,68 ± 0,64
Mélibiose & isomaltose	2,23 ± 0,38	0,64 ± 0,38	0,88 ± 0,38	0,00 ± 0,38	0,00 ± 0,38	0,71 ± 0,38	1,27 ± 0,38	0,64 ± 0,38	0,00 ± 0,38	0,00 ± 0,38
Sucrose	4,87 ± 0,10	0,00 ± 0,10	0,54 ± 0,10	0,31 ± 0,10	0,37 ± 0,10	0,30 ± 0,10	0,68 ± 0,10	1,41 ± 0,10	1,22 ± 0,10	0,00 ± 0,10
Tréhalose	1,89 ± 0,10	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Palatinose	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,08	0,00 ± 0,08
Raffinose	0,00 ± 0,12	0,05 ± 0,12	0,00 ± 0,12	0,00 ± 0,12	0,00 ± 0,12	0,00 ± 0,12	0,00 ± 0,12	0,00 ± 0,12	0,00 ± 0,12	0,00 ± 0,12
Erllose	0,00 ± 0,16	0,52 ± 0,16	1,12 ± 0,16	0,30 ± 0,16	0,53 ± 0,16	1,19 ± 0,16	1,87 ± 0,16	1,10 ± 0,16	0,00 ± 0,16	0,45 ± 0,16
Mélezitose	0,22 ± 0,40	0,09 ± 0,40	0,00 ± 0,40	0,00 ± 0,40	0,03 ± 0,40	0,00 ± 0,40	0,00 ± 0,40	0,00 ± 0,40	0,09 ± 0,40	0,00 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32	0,00 ± 0,32	0,00 ± 0,32	0,00 ± 0,32	0,00 ± 0,32	0,00 ± 0,32	0,00 ± 0,32	0,00 ± 0,32	0,00 ± 0,32	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,59	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09	0,00 ± 0,09

I.2.5. Carbohydrates

Selon Terrab *et al.*, (2001) et Nagai *et al.*, (2002), les glucides des miels sont essentiellement des monosaccharides réducteurs tels que le glucose et le fructose qui représentent à eux seuls 90 % de la matière sèche totale du miel (Gonnet, 1982). La teneur en fructose des 10 échantillons varie entre 25,20 % ± 3,32 (M1) et 37,81% ± 3,32 (M3) ; celle du glucose est comprise entre 21,45% ± 2,14 (M1) et 30,95 % ± 2,14 (M10).

Ces résultats concordent avec ceux établis par Gonnet (1979) qui précise que la teneur des miels varie de 32,40 à 45,90 % pour le fructose et de 25,50 à 40,80 % pour le glucose. Les taux de saccharose des miels des régions étudiées varient de 0 à 4,87% ± 0,10. Tous nos échantillons correspondent aux normes établies par Bocquet (1997) qui fixe une limite maximale de 10 % de saccharose.

I.3. Discussion

I.3.1. Analyse pollinique

Le **tableau 1** met en évidence trois variétés de miels monofloraux, à savoir des miels d'Eucalyptus (échantillons M5 et M8), du miel de jujubier : échantillon (M2), ainsi que du miel de citrus : Oranger (échantillon M9) ; des miels multifloraux [(M6 et M10 (Asteracées), M7 (Rhamnacées)]. Les trois autres échantillons multifloraux (M1, M2 et M3) ne présentent pas de dominance particulière.

Pour ce qui est du pollen d'accompagnement on constate surtout la présence d'apiacées (5%), de brassicacées (5%), de fabacées (4%) ainsi que de rosacées et d'asteracées (2% pour chaque). Dans une étude par Makhloufi *et al.*, (2010) sur treize échantillons de miels originaires de Tiaret 5 d'entre eux présentaient une dominance d'eucalyptus et un échantillon avec du pollen d'eucalyptus comme pollen d'accompagnement, dans la même étude les seuls deux échantillons provenant de Relizane étaient à pollen de Citrus

dominant pour l'un et d'accompagnement pour l'autre. Le miel de citrus et d'eucalyptus étaient parmi les miels dominants dans une étude sur les miels du nord de l'Algérie. Selon **Ricciardelli d'Albore (1998)**, les Citrus, l'Eucalyptus et le Trifolium constituent les principales espèces mellifères en Algérie.

I.3.2. Analyses physico-chimiques

❖ Teneur en eau,

La teneur en eau est le plus important critère quant à la qualité du miel, spécialement en regard de sa dégradation par fermentation. Généralement le miel de miellat a une teneur en eau en deçà de celui de nectar (**Oddo et Piro, 2004**). La teneur en eau ne constitue pas une caractéristique typique de la variété de miel. Elle dépend d'autres facteurs, tels que type de ruche et humidité de l'air.

❖ pH et acidité libre.

Tous les miels sont acides, avec un pH généralement compris entre 3,5 et 5,5. Ceci est dû à la présence d'acide organique qui contribue à la saveur du miel et sa stabilité contre la dégradation microbienne (**Mato et al.,1997**).

Les miels de fleurs ont certes moins d'acides que les miels de forêt, leur pH est toutefois plus bas, le miel de forêt étant, semble-t-il, mieux tamponné.

Le pH du miel varie en fonction de la région. Les variations du pH peuvent être attribuées à la diversité des plantes mellifères des régions où les échantillons des miels ont été collectés (**Mbogning et al.,2011**). Nos résultats concordent avec ceux de (**Chakir et al.,2011**) sur les miels Marocain.

La teneur en acide libre varie selon la variété de miel. Dans les miels de miellat, elle est généralement supérieure à celle des miels de fleurs. C'est également une mesure pour la fermentation du miel

Les valeurs de pH de 3.7 ± 0.2 (M6) à 5 ± 0.2 (M1), de teneur en eau : 13.76 ± 0.2 (M3) et 18.05 ± 0.2 (M1), ainsi qu'en acidité libre : 8.3 ± 1.05 (M7) et 26.1 ± 1.05 (M1) font que nos miels satisfassent largement aux normes internationales (**annexe**). Des valeurs de pH de 5,0 et plus indiquent généralement un miel de miellat, ce qui semble être le cas pour l'échantillon (M1), d'autant plus que sa conductivité électrique est supérieure à $0,8 \text{ mS/cm}$ (Makhloufi et al., 2010). Le fait qu'il soit le plus riche en eau pourrait faire plutôt pencher en faveur d'un miel mixte (mélange de nectar et de miellat).

❖ Conductivité électrique

La conductivité électrique dépend de la teneur en cendres et de l'acidité du miel : plus ces dernières sont élevées et plus la conductivité correspondante est élevée (Vorwohl, 1964).

Il existe une relation linéaire entre ces grandeurs mesurées (Golob et al., 2005 ; Piazza et al., 1991). Conformément à la directive de l'UE (Commission européenne, 2002) le miel de nectar doit avoir une conductivité d'au plus $0,8 \text{ mS/cm}$. Des valeurs plus élevées sont considérées comme appartenant au miel de miellat ou mélanges de miellat et de miel de nectar (miel mixte). Toutes nos variétés présentent des conductivités électriques variant entre $0,23 \pm 0,01 \text{ mS/cm}$ (M4) et $0,57 \text{ mS/cm} \pm 0,01$ (M5) sauf le miel (M1) qui pourrait être classé comme miel de miellat ou miel mixte ; ce qui semble être en accord avec son pH (5.0 ± 0.2), ce qui conforte notre précédente hypothèse quant à ce miel.

❖ Diastases, invertases et HMF

L'hydroxyméthylfurfural (5-hydroxy-méthyl-2-furaldéhyde) (HMF) se forme spontanément comme intermédiaire dans la réaction de Maillard (**Machiels et Istasse, 2002**), qui est pour rappel une réaction entre les résidus aminés des protéines ou des acides aminés et des sucres réducteurs, et comme produit typique de dégradation des hexoses lors de la caramélisation. Dans le miel, **Morales (2009)** précise que l'HMF y est naturellement présent en très petites quantités et qu'il est produit par l'action de l'acidité normale du miel sur les sucres réducteurs et le saccharose habituellement à température ambiante. la concentration en HMF dans le miel augmente suite à un traitement thermique et/ou à un stockage à une température inappropriée (**Escricheet al., 2008**). Des études faites par **Makhloufi (2001)** sur des miels Algériens, montrent des valeurs allant de 9.6 à 157.44mg/kg, avec une moyenne de 42.6 mg/kg.

Le traitement thermique du miel entraîne simultanément une diminution de l'activité diastasique et de l'activité de l'invertase. L'activité diastasique désigne l'activité d'une enzyme appelée diastase ou α -amylase. Celle-ci est naturellement présente dans le miel car elle est sécrétée par les abeilles afin d'hydrolyser l'amidon et les sucres complexes contenus dans les nectars et miellats qu'elles récoltent, dans le but de s'en nourrir.

L'application d'un traitement thermique au miel entraîne une diminution de l'activité de cette enzyme. Afin de s'assurer que le miel n'a pas subi un traitement thermique excessif, la **Directive 2001/110/CE** impose un indice diastasique supérieur ou égal à 8 sur l'échelle de Schade. L'activité de l'invertase désigne quant à elle l'activité d'une enzyme appelée invertase ou α -glucosidase.

Celle-ci est aussi naturellement présente dans le miel car elle est sécrétée par les abeilles afin d'hydrolyser le saccharose, contenu dans les nectars et miellats qu'elles récoltent, en glucose et fructose dans le but de s'en nourrir. L'application d'un traitement thermique au miel entraîne également une diminution de l'activité de cette enzyme. L'indice d'activité de l'invertase est dès lors aussi un paramètre de qualité du miel qui renseigne sur « l'état de fraîcheur » de ce dernier. (**International Honey Commission, 2009**). La sensibilité de l'enzyme à la température est très élevée, mais sa vitesse de destruction une température en deçà de 15°C est très faible. A 20 ° la diminution de l'activité de l'invertase est de 1,5 à 1,7% par mois. À une température supérieure, la perte de l'activité en fonction de la température peut être encore plus élevée (**Vorlová et Přidal, 2002**). Les régions de provenance de ces miels jouissent de températures de beaucoup plus élevées. Cela pourrait expliquer le fait que l'activité de cette enzyme soit indétectable dans les échantillons **M2**, **7,8** et **9**. Cette activité indétectable associée à la teneur assez élevée en HMF de **M2** (78.4 ± 1.9) pourrait être un indicateur de chauffage de ce miel ou bien une exposition à une chaleur ambiante assez élevée, cette dernière supposition semble la plus probable vu l'indice diastasique (15.1 ± 2.8). L'indice d'activité de l'invertase n'est actuellement pas inclus dans les standards internationaux de qualité du miel.

L'activité diastasique de nos échantillons de miels varie entre 15.1 unités de Schade/g $\pm 2,8$ et 26 unités de Schade/g $\pm 2,8$. Nous sommes en présence de miels frais, de qualité conformes aux normes. Cette ID, par contre, est très légèrement en deçà pour ce qui est du miel (**M4**) : $7,2 \pm 2,8$ et (**M9**) : $7,3 \pm 2,8$. Cependant, sauf comme cité plus haut sauf en ce qui concerne le miel **M2** la teneur en HMF de ces miels est très en deçà des normes admises (**annexe**).

❖ Carbohydrates (cf tableau 4)

Le miel se compose d'environ 80% d'hydrates de carbone (**Bogdanov et Gallmann, 2006**), les glucides des miels sont essentiellement des monosaccharides réducteurs tels que le glucose et le fructose qui représentent à eux seuls 90 % de la matière sèche totale du miel (**Gonnet, 1982**). A cela s'ajoute de petites quantités de disaccharides, trisaccharides et d'autres oligosaccharides (**Persano Oddo et al., 1995; Persano Oddo and Piro, 2004**). Le fructose prédomine dans presque tous les types de miels (**White, 1979**). Ce qui est le cas pour nos échantillons. Les taux de saccharose (sucrose) de nos miels varient de 0.00 ± 0.10 à 4.87 ± 0.10 . Tous nos échantillons correspondent aux normes établies par **Bocquet (1997)** qui fixe une limite maximale de 10 % de saccharose. Il est bien connu qu'il existe des différences de composition entre miels de miellat et ceux de nectar (**Bogdanov et al., 2004**). La teneur relativement plus élevée du miel M1 en mélézitose et en tréhalose et la plus basse en carbohydrates semble confirmer l'hypothèse que ce miel est un miel mixte ou de miellat (**Makhloufi et al., 2010**).

Deuxième partie

Effet Antioxydant

Introduction

Les substances naturelles représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. De récentes études suggèrent qu'une alimentation riche en produits végétaux semble apporter une protection contre le développement de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives, l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde et même certains cancers. *In-vitro*, les polyphénols démontrent une puissante activité antioxydante par leur capacité de piéger une large gamme d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote telles que l'anion superoxyde et le radical hydroxyle, les acides hypochloreux et peroxy-nitieux (Silva *et al.*, 2002 ; Pannala *et al.*, 1997 ; Ketsawatsakul *et al.*, 2000; Mira *et al.*, 2002). Ainsi, les polyphénols sont capables de protéger les lipides polyinsaturés contre les phénomènes d'oxydation générateurs de radicaux et aldéhydes lipidiques responsables du développement des maladies évoquées plus haut. Ces composés font l'objet d'un intérêt croissant en raison de leur rôle potentiel contribuant à la santé humaine. Le miel représente une source très riche et renouvelable d'antioxydants naturels. Dans les dernières décennies il y a eu un intérêt croissant pour l'étude du miel comme un antioxydant naturel dans différentes régions du monde.

L'objectif de cette parties de notre études a pour but en premier lieu de déterminer les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de nos échantillons de miel, et de vérifier s'ils s'inscrivent en deçà en delà ou dans la fourchette moyenne des miels mondiaux. En deuxième lieu et par le biais de deux méthodes couramment utilisés en concomitance, d'estimer leurs propriétés antioxydantes et enfin si une corrélation existe entre ces dernières et le taux des polyphénols.

Matériel & Méthodes

II.1. Taux des polyphénols totaux (réactif de Folin Ciocalteu)

Le dosage des polyphénols par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu selon (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999)

❖ Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans le miel.

❖ Mode opératoire

Trente microlitre de solution de miel (0,1 g / ml) a été mélangé avec 2,37 ml d'eau Milli Q et 150 μ l Folin-Ciocalteu à 0,2 N. La solution a été soigneusement mélangée au vortex et incubée pendant 2 min à température ambiante. 450 microlitres de solution de carbonate de sodium (0,2 g / ml) a été ajoutée au mélange réactionnel et incubées pendant 2 h à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 765 nm. La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée par comparaison avec une courbe standard préparée avec de l'acide gallique

Pour s'assurer de la fiabilité et de la répétabilité des résultats, le dosage de chaque miel a été réalisé en triplicate, suivi du calcul de la moyenne des densités optique mesurées.

La quantité de polyphénols totaux, exprimée en mg équivalents acide gallique par 100g de miel, est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage tracée avec l'acide gallique ($y = 12,31x + 0.0179$; $R^2 = 0.9999$). (Figure 01)

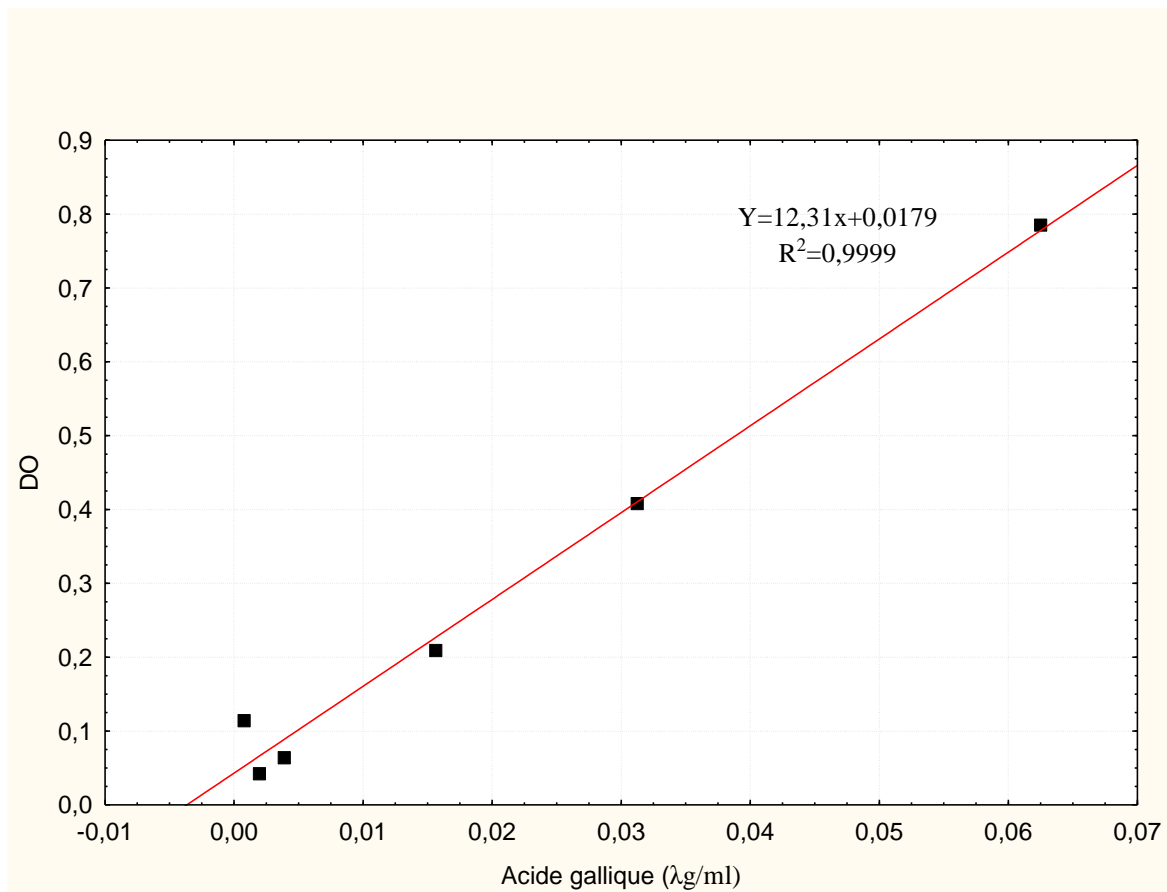


Figure 01: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

II.2. Taux des flavonoïdes totaux

Le taux de flavonoïdes (TFC) a été déterminé en utilisant le test de chlorure d'aluminium selon la méthode de (Amaral et al.2009).

❖ Principe

Le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxyles OH des phénols ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 420 nm.

❖ Mode opératoire

Un volume de 10 µl d'une solution de miel de 10% (w / v) a été ajouté dans les puits d'une microplaque à 96 puits, puis 30 µl de nitrite de sodium à 2,5%, 20 µl de solution de chlorure d'aluminium à 2,5% puis 100 µl d'une solution d'hydroxyde de sodium à 2% ont été ajoutés successivement. Les échantillons ont été bien mélangés et l'absorbance a été mesurée à 450 nm.

La quantité de flavonoïdes totaux, exprimée en mg équivalents catéchine par 100g de miel, est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage tracée avec la catéchine ($y = 22,841x + 0,0553$; $R^2 = 0,9997$). (Figure 02)

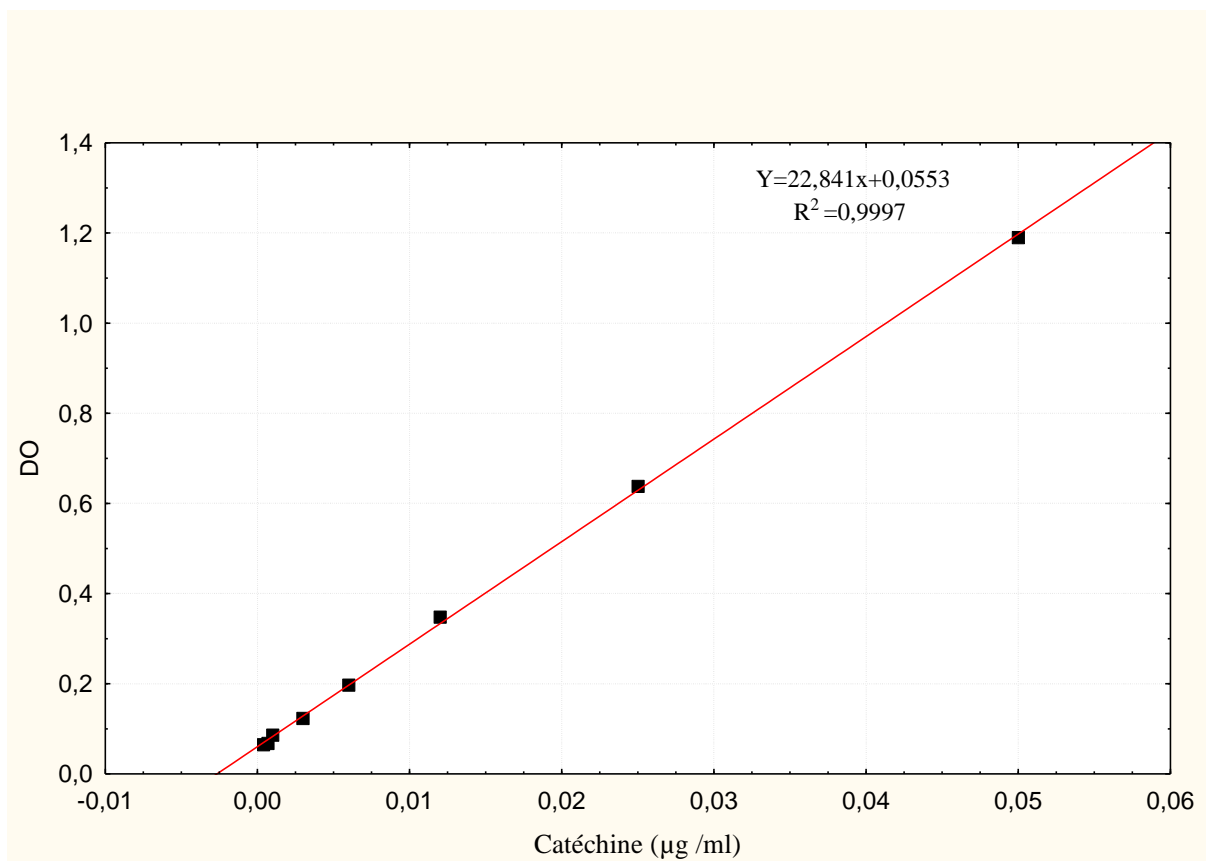


Figure 02: Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

II.3. Activité antiradicalaire des miels (piégeage de radical libre DPPH).

L'évaluation de l'Activité antiradicalaire du miel a été effectuée par le piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon la méthode de **Chen et al. (2007)**.

❖ Principe

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphényl picryl -hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (**Sanchez-Moreno, 2002**).

❖ Mode opératoire

- Le DPPH a été dissous dans de l'éthanol absolu à une concentration de 0,2 mM.
- 100 µl de solution de miel (0,1 g / ml) a été diluée à 500 µl avec 70% d'éthanol, et vigoureusement mélangés au vortex avec 400 µl de solution de DPPH.
- Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 min et l'absorbance de la solution (T1) a été mesurée à 517 nm.
- Un blanc simple (B1) était composé de 600 µl d'éthanol à 70% et 400 µl de DPPH alors que le blanc vierge de DPPH (B2) contenait 100 µl d'échantillon de miel, 500 d'éthanol à 70% et 400 µl d'éthanol absolu. L'activité de piégeage DPPH a été calculée en utilisant la formule suivante:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = [1 - \{(T_1 - B_2) / B_1\}] \times 100$$

ou T1, B1, and B2 sont les absorbances de l'échantillon, du blanc vierge de miel et du blanc vierge du DPPH, respectivement.

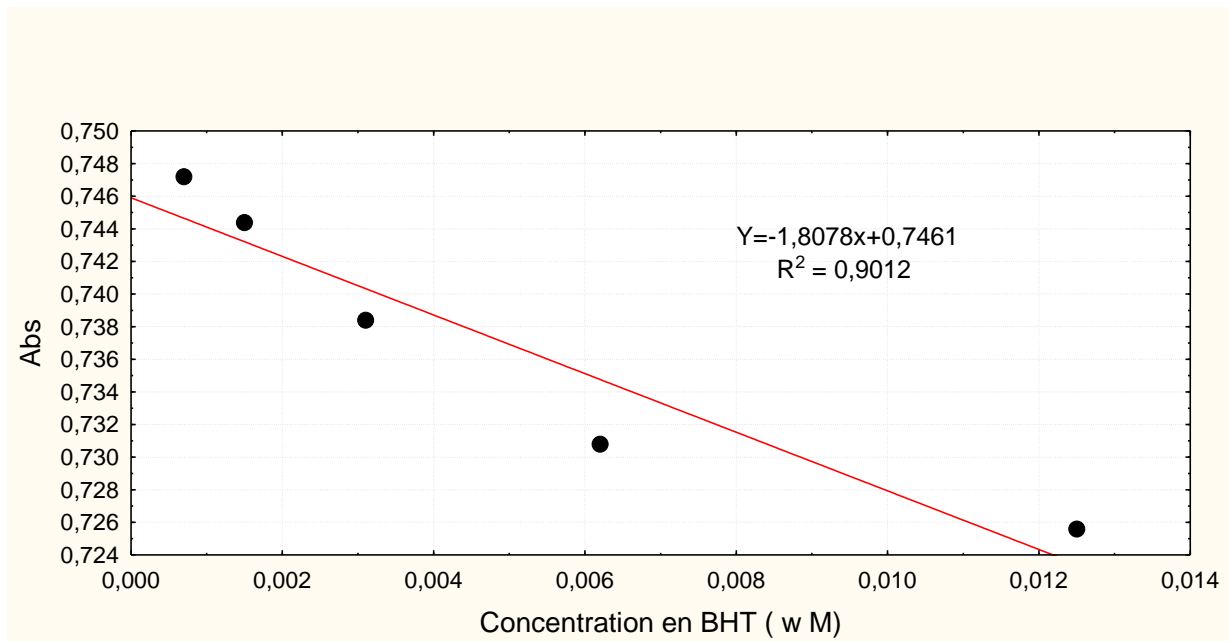


Figure 04: Courbe d'étalonnage du radical DPPH

II.4: Essai FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

L'activité réductrice du fer de nos extraits déterminée selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**, basée sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$

❖ Principe

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}), l'intensité de cette coloration est mesuré par spectrophotométrie à 700 nm.

❖ Mode opératoire

- Un millilitre d'extrait éthanolique de miel (10% v / v) est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%.
- L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite ;

- 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés et mélangé au vortex pour stopper la réaction
- Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes ;
- 2,5 ml du surnageant a été mélangé avec une quantité égale d'eau Milli Q et 0,5 ml de FeCl_3 à 0,1% fraîchement préparé.
- La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant le miel par de l'eau distillée.
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; Le Butylhydroxytoluène (BHT) dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.
- Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés

La quantité de flavonoïdes totaux, exprimée en mg équivalents catechine par 100g de miel, et est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage tracée avec le BHT ($y = 22,841x + 0.0553$; $R^2 = 0.9997$). (Figure 03)

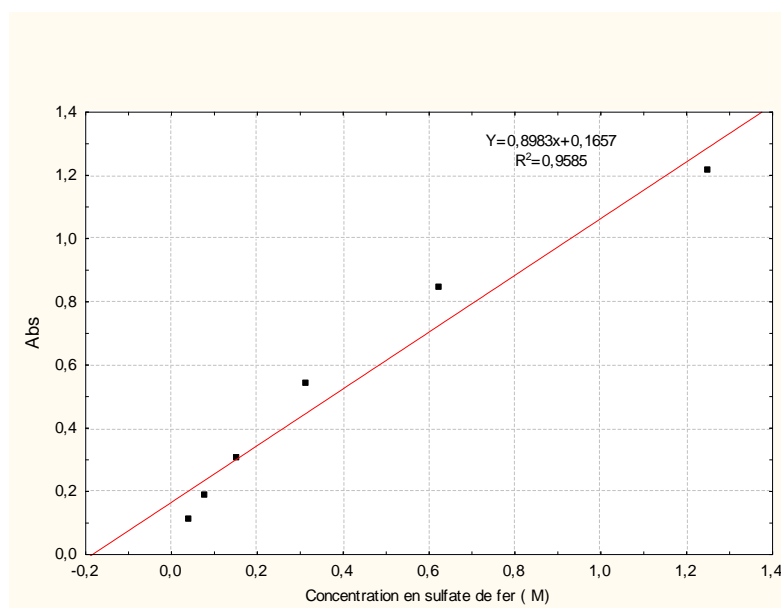


Figure 03: Courbe d'étalonnage de sulfate de fer pour l'activité réductrice du fer

II.5. Analyse statistique :

Les données expérimentales du dosage et l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues ont été exprimés par une moyenne et plus ou moins l'écart type. Les corrélations ont été établies en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson (r) dans corrélations linéaires à deux variables ($p < 0,01$). Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Statistica 7.0.

Résultats & Discussion

II.1. Taux des polyphénols et des flavonoïdes totaux

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux a été respectivement effectué par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocaltheu et celle au chlorure d'aluminium (AlCl_3). Malgré sa sensibilité et sa simplicité la méthode Folin, n'est pas spécifique des polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, l'acide ascorbique et des composés soufrés (Singleton *et al.*, 1999).

Les résultats obtenus, présentés dans le **tableau 1**, déterminés à partir de courbes étalons (**figures 1 et 2**), sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 100 g de miel (mg EAG/100g) pour les polyphénols, et en mg équivalent catéchine par 100 g de miel (mg EC/100g) pour les flavonoïdes.

Echantillons	Taux des polyphénols totaux (mg EAG/100 g \pm SD)*		Taux des flavonoïdes totaux (mg EC/100 g \pm SD)*	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
M1	97,35	1,78	11,72	0,29
M2	85,62	2,75	9,81	0,07
M3	95,36	6,08	9,48	0,20
M4	70,95	2,59	8,57	0,09
M5	101,90	6,72	10,90	0,52
M6	128,87	0,97	21,77	0,46
M7	82,85	14,24	9,94	0,54
M8	65,31	1,60	7,10	0,04
M9	64,29	1,55	5,41	0,04
M10	63,93	0,11	6,97	0,00

*Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions \pm écart type

II. 2. Activité antioxydante

II. 2.1. Activité antiradicalaire des miels (piégeage de radical libre DPPH).

Le DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl) est l'un des radicaux libres les plus stables et les plus fréquemment utilisés dans l'évaluation des piègeurs de radicaux dans les aliments naturels (**Burda et Oleszek, 2001**). La méthode de dosage du DPPH est très simple et est aussi rapide pour l'analyse manuelle du contenu antioxydant. La méthode DPPH qui peut être utilisée pour les échantillons solides ou liquides n'est pas seulement spécifique à un antioxydant en particulier, mais s'applique aussi à la capacité antioxydante globale de l'échantillon.

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant SH, NH et OH groupes (**Salah et al., 1995**). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles (**Mensor et al., 2001 ; Maataoui et al., 2006**)

Les effets antiradicalaires des miels algériens ont été testés en utilisant une solution méthanolique du radical libre DPPH qui présente une couleur violet foncé avec une absorption maximale à 517 nm. Le radical libre DPPH a également l'avantage de ne pas être affecté par certaines réactions secondaires, comme la chélation des ions métalliques et l'inhibition enzymatique (**Amorowicz et al., 2004**).

Les résultats obtenus, présentés dans le **tableau 2**, déterminés à partir de courbes étalons. **Figures 3 et 4**), sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par 100 g de miel (mg EAA/100g).

II.2.3. Pouvoir réducteur: Essai FRAP (Ferric Reducing antioxydante power)

Cette technique a été initialement développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe participe à la formation du très réactif radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 2** :

Echantillons	Piégeage du radical DPPH (% \pm SD)*		Pouvoir réducteur (mg/100 g \pm SD)*	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
M1	21,03	3,66	502,22	38,33
M2	26,93	3,22	838,13	59,66
M3	22,49	11,71	616	66,98
M4	22,70	5,33	270,78	95,16
M5	24,42	2,68	958,42	51,24
M6	23,17	5,17	281,47	13,46
M7	29,76	5,36	223,19	18,10
M8	42,65	22,34	150,45	9,36
M9	28,95	4,64	45,19	22,19
M10	30,11	8,45	100,30	14,79

*Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions \pm écart type

A l'état quiescent, il existe un équilibre entre la production d'RLO et la capacité antioxydante intracellulaire. Cet équilibre peut être temporairement rompu, soit par accroissement des RLO, soit par diminution des capacités de neutralisation. Cette surproduction de RLO va se traduire par de nombreuses oxydations au niveau des macromolécules biologiques telles que les acides gras polyinsaturés (fixation d'un radical sur une double liaison), les protéines (modification de leur structure) et de l'ADN (rupture des chaînes bicaténares). Cependant, ces dommages tissulaires et l'inflammation qui en découle semblent pouvoir être limités par l'ingestion d'un ou plusieurs antioxydants (**Powers & Hamilton, 1999**). Le terme antioxydant

regroupe « toutes substances qui, présentes à faibles concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat » et permettent de maintenir l'homéostasie cellulaire (**Halliwell & Gutteridge, 1990**).

Les polyphénols (flavonoïdes et acides phénoliques), sont un groupe important de composés phytochimiques impliqués dans l'activité antioxydante du miel (**Gheldof & Engeseth, 2002; Gheldof et al., 2002; Aljadi & Kamaruddin, 2004; Beretta et al., 2005; Baltrusaityte et al., 2007, Estevinho et al., 2008**).

Les propriétés antioxydantes *in vitro* des agents naturels ou synthétiques sont mesurées par le biais de l'activité anti-radicalaire par piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ainsi que par le biais du pouvoir réducteur (FRAP) essayés entre autres (**Gheldof et al., 2002 ; Hussein et al. 2011**). Grâce à ces essais, il a été montré que différentes variétés de miel provenant de divers pays et régions géographiques présentent des propriétés antioxydantes élevées (**Erejuwa et al., 2011**).

La teneur en composés phénoliques totaux (AGE /100 mg g de miel) des miels algériens déterminée à l'aide de l'acide gallique comme standard ($R^2 = 0,9999$) **table 1**, a été trouvée dans la gamme de 63,93 à 95,36. Le contenu phénolique total de certains échantillons de miel a été préalablement déterminé par exemple **Meda et al., 2005** ont rapporté que les polyphénols totaux du miel de Burkina Faso étaient de 32,59 à 114,75 mg AGE /100 g. Un niveau de contenu phénolique presque similaire a également été observé pour les miels de miel roumains dont le contenu phénolique variait de 23,0 à 125,0 mg AGE / 100 g (**Ai ml et al., 2009**). Pour les miels indiens et croates, la teneur en composés phénoliques variait de 48 à 99 et de 31,72 à 80,11 mg AGE / 100 g, respectivement (**Saxena et al., 2010 ; Krpan et al., 2009**). La teneur en polyphénols des miels marocains quant à eux étaient de 16,38 à 92,37 mg(AGE)/100mg. Pour ce qui est des miels Algériens peu d'études ont été réalisées dessus. Une étude faite par **Khallil et al., (2012)** sur quatre échantillons de miels Algériens a révélé une

teneur en polyphénols allant de 41,1 à 49,8 AGE/100mg de miel. Selon **Alzahrani et al., (2012)** le miel Algérien de carotte sauvage (un seul échantillon) possède une teneur en polyphénols de $50,3.09 \pm 0,82$ AGE/100mg de miel.

Pour ce qui est de la teneur en flavonoïdes avec la catéchine comme standard ($R^2 = 0,9997$), nos résultats ont été plus que probants vu que cette teneur était entre 5,41 et 21,77 EC/100 mg bien plus que les résultats observés par **khallil et al., (2012)** sur les miels Algériens en utilisant le même étalon standard et qui était de 2,70 à 7,17 mg CE/100mg de miel, cette large différence pourrait être due à l'état de fraîcheur, l'origine botanique ou l'origine géographique.

Mais et est encore plus supérieures à celle des miels cubains $1,09 \pm 0,03$ à $2,52 \pm 0,03$ EC/100mg, à ceux du Burkina Faso 0,5 à 2,5 CE/100mg (**Alvarez-Suarez et al., 2010**). Cependant nos résultats sont bien en deçà de ceux des miels portugais avec une teneur de 53,70 et 49,44(mg CE/100mg) (**Estevinho et al., 2012**). Il est à signaler que comparativement aux polyphénols peu d'études ont porté sur le dosage des flavonoïdes.

Selon **Antolovic et al., (2002)**, la popularité de la méthode DPPH peut être attribuée à la simplicité et la rapidité d'analyse, cependant, la pertinence des données générées par cette procédure doit être considérée avec précaution. D'un autre côté, en regard de la différence sur les conditions expérimentales, la comparaison avec les résultats de bon nombre d'auteurs serait biaisée, vu la différence entre les étalons utilisés. Bon nombre d'auteurs également se basent sur l' EC_{50} , cependant, La cinétique de réaction entre le DPPH et les antioxydants ne sont pas linéaires aux concentrations de DPPH. Il est donc assez arbitraire d'exprimer la capacité antioxydante en utilisant l' EC_{50} (**Huang et al., 2005**).

Nos résultats pour le DPPH : $21,03 \pm 3,66$ à $42,65 \pm 22,34$ mg EAA/100mg de miel (**table2**) sont presque similaires à ceux de **Khallil et al., (2012)** qui a observé un maximum de 4.57% d'inhibition pour les miels, algériens testés (04 échantillons). Ils s'inscrivent également dans

la fourchette observée pour les miels portugais 9,87-44,19 mg EAA/100mg de miel (Lachman *et al.*, 2010)

Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaire *in vitro*: ils transforment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radical hydroxyl ($\bullet OH$) (via la réaction de Fenton), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique. En situation physiologique, la concentration libre de fer ou de cuivre est particulièrement basse, ces métaux étant séquestrés par des protéines spécialisées comme la ferritine, de sorte que cette réaction n'a pas lieu (Afonso *et al.*, 2007). Cependant, des affections cliniques dues à l'effet oxydatif consécutif à une surcharge en fer ont été observées lors de cardiopathie, athérosclérose, néoplasie et affection chronique telles que celles du foie, hémochromatose, obésité et diabète type II (Puntarulo, 2005). Nos résultats (table 2) démontrent clairement que nos échantillons de miel possèdent la capacité de réduire les ions ferriques et de diminuer éventuellement les effets délétères dus à la réaction de Fenton. Le résultat obtenu avec l'échantillon 5 : $958,42 \pm 51,24$ mg EBHT/100mg de miel témoigne du pouvoir réducteur de certains miels algériens, bien plus que le fameux miel de Manuka.

La capacité antioxydante de différents miels dépend de l'origine botanique, des facteurs saisonniers et environnementaux ainsi que des conditions de collecte (Al-Mamary *et al.*, 2002; Gheldof *et Engeseth*, 2002). Malgré que l'activité antioxydante du miel est la combinaison d'une large gamme de substances actives, le contenu en composés phénolique peut refléter dans une certaine mesure l'activité antioxydante totale du miel (Beretta *et al.*, 2005). Cependant, le niveau des composés phénoliques présent dans le miel n'est pas toujours pas toujours positivement proportionnel à son activité antioxydante (Al-Mamary *et al.*, 2002; Küçük *et al.*, 2007).

La capacité antioxydante d'un certain nombre de miels a été déterminé et trouvé être significativement corrélée à la teneur en composés phénoliques (Gheldof et al., 2002). Ce qui semble ne pas être le cas au vu de nos résultats que ce soit pour les polyphénols ou les flavonoïdes.

Cependant, Selon (Al-Mamary et al., (2002) et Küçük et al., (2007), cette teneur de composés phénoliques n'est pas toujours positivement proportionnelle à son activité antioxydante. En effet, les flavonoïdes ou polyphénols testés seuls dans des systèmes *in vitro*, ne reflètent nullement l'activité antioxydante totale de miel (Gheldof et al. 2002). Ainsi, le consensus général est que ces composés sont impliqués, mais ne sont pas entièrement responsable de cette activité. L'explication de cette activité pourrait être due à la présence de types variés de polyphénols, à l'origine d'une activité variée de piégeage des radicaux libres (Küçük et al., 2007).

Corrélation entre les teneurs (flavonoïdes, polyphénols) et l'efficacité antiradicalaire

Nous avons voulu établir une corrélation entre l'efficacité antiradicalaire et les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux. Nous remarquons la présence d'une faible corrélation entre les teneurs en phénols totaux des miels et le DPPH avec un $R^2 = 0.2557$. Pour les flavonoïdes, nous obtenons une très faible corrélation avec $R^2 = 0.1946$. (**figure 5**)

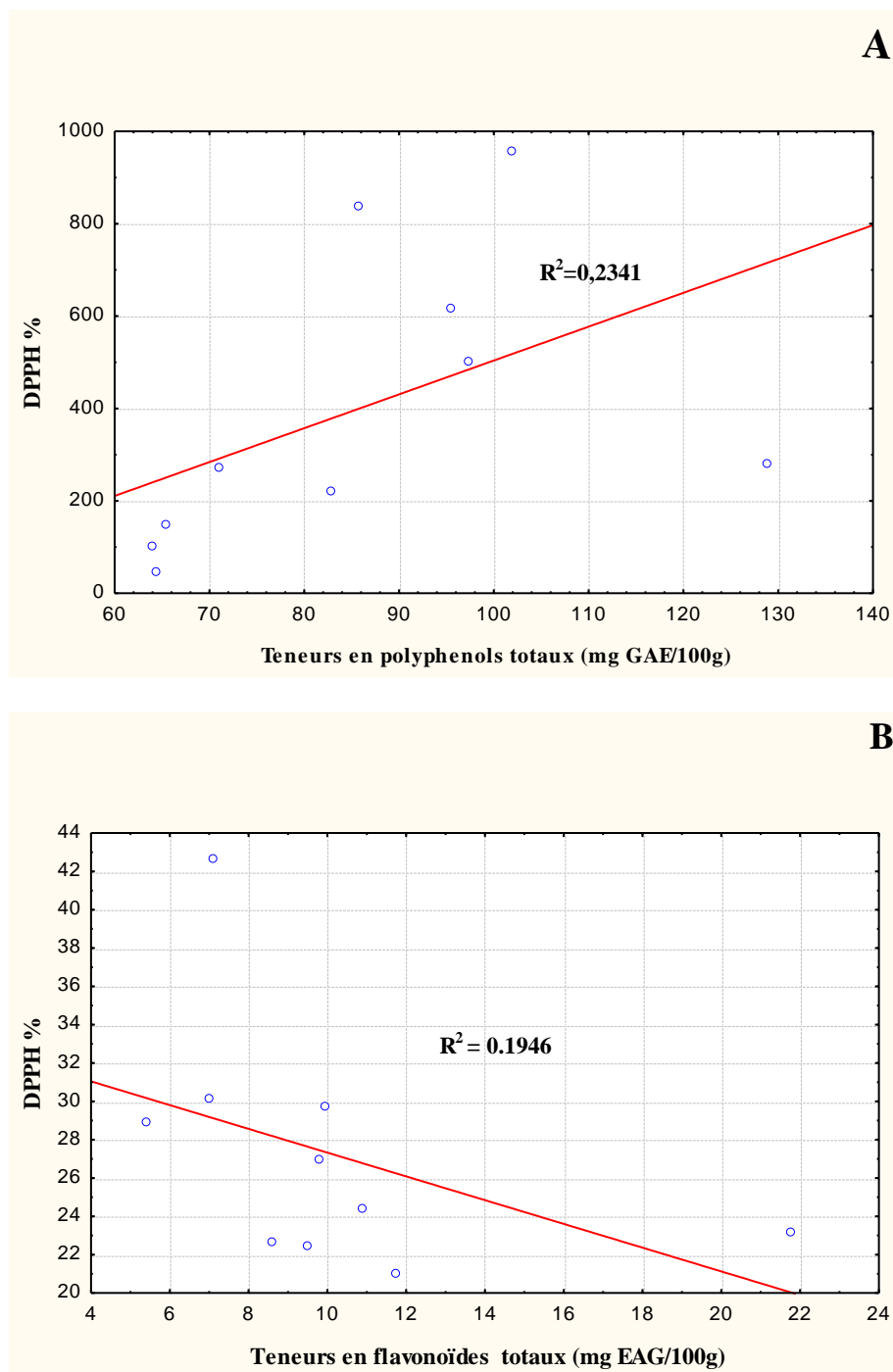


Figure 5 : Corrélation entre l'efficacité antiradicalaire exprimée en % et les teneurs en Polyphénols totaux (A) et les flavonoïdes totaux (B)

✚ Corrélation entre les teneurs (flavonoïdes, polyphénols) et pouvoir réducteur (FRAP)

Pour les teneurs en phénols totaux des miels et le FRAP nous remarquons la présence d'une faible corrélation $R^2 = 0.2341$, Pour les flavonoïdes, nous obtenons une très faible corrélation avec $R^2 = 0.0339$ (figure 6)

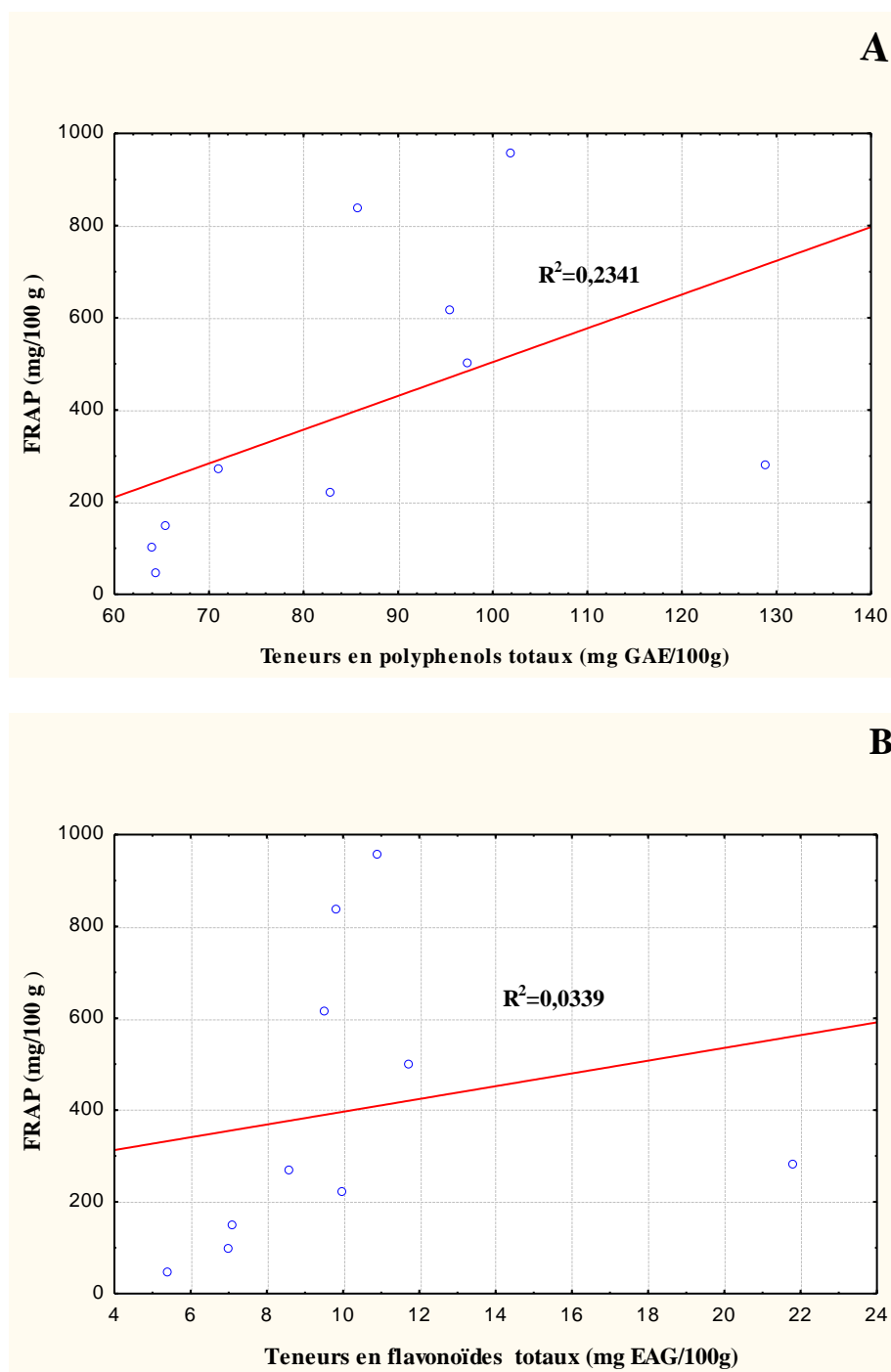


Figure 6 : Corrélation entre la réduction de fer exprimée en mg/100 g et les teneurs en

Polyphénols totaux (A) et les flavonoïdes totaux (B)

Troisième partie

Propriétés Antimicrobiennes

Introduction

La recrudescence des maladies infectieuses et les difficultés rencontrées dans leur traitement ont sans doute pour cause la résistance accrue des souches microbiennes aux drogues en usage. Aujourd'hui, la résistance des micro-organismes aux agents antimicrobiens est devenue l'un des problèmes majeurs des thérapeutiques anti-infectieuses. Face à ces constats, la recherche de nouveaux agents antimicrobiens s'est avérée nécessaire et s'est orientée vers la médecine traditionnelle, qui devient alors une des plus importantes et intéressantes pistes à explorer pour la recherche de nouveaux produits antimicrobiens plus efficaces.

Selon l'OMS, près de 80% des populations des pays en voie de développement de la région d'Afrique ont recours à la médecine traditionnelle (**Farnsworth et al. 1985; OMS, 2002b**).

Les produits de la ruche ont été employés pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines et même animales, parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques certaines. Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne dans la prise en charge des maladies, l'apithérapie est devenue, à l'heure actuelle, l'une des issues les plus empruntées pour se soigner et lutter contre ces maladies.

Le miel représente une option thérapeutique alternative très intéressante qui ne doit pas être négligée. Ses propriétés antimicrobiennes, connues depuis l'Antiquité, sont démontrées par des études contemporaines. La puissante activité *in vitro* du miel contre les bactéries et les champignons résistants aux antibiotiques, et les résultats prometteurs obtenus lors de l'application du miel, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs qui ont tenté par ce fait de caractériser leur pouvoir anti-infectieux. Des études scientifiques ont démontré que les propriétés antimicrobiennes du miel sont dues notamment à son osmolarité, à son pH acide et à la génération d'eau oxygénée lorsqu'il est appliqué sur la plaie. Le miel peut également contenir des substances antimicrobiennes telles que la défensine-1 et le méthylglyoxal (**Brudzynski, 2012 ;Israili, 2013**).Mais ils ne sont pas les seuls à en être responsables.

Des molécules comme les polyphénols, flavonoïdes, enzymes, antibiotiques peptidiques, produits de la réaction de Maillard (**Brudzynski&Miotto, 2011 ;Kwakman et al., 2011**), et probablement d'autres composés mineurs, semblent contribuer également à ce pouvoir anti-infectieux.

L'ouest Algérien, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes mellifères y poussent spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Le profil biologique du miel de plusieurs pays a été déjà étudié. Jusqu'à présent, très peu d'études portant sur les propriétés antimicrobiennes du miel Algérien ont été réalisées.

Cette partie d'étude a pour but de tester quelques échantillons de miels d'origines botaniques différentes sur des souches bactériennes et fongiques cliniques et standards (ATCC), dans l'objectif d'évaluer leurs efficacités *in vitro*. Et ce, en utilisant les techniques préconisées par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), et agréées par la majorité des pays dont le nôtre.

Matériel & Méthodes

III. Techniques et méthodes expérimentales

Dans cette partie, nous allons tout d'abord décrire les conditions de culture des six microorganismes utilisés dans cette étude. Puis, nous exposerons les protocoles des différentes méthodes utilisées. Enfin, nous détaillerons les méthodes d'évaluation des activités antimicrobiennes.

III.1. Matériel biologiques

Les tests d'évaluation des activités antimicrobiennes ont été réalisés contre cinq souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Candida albicans* ATCC 10231 .Toutes ces souches nous ont été fournies par l'institut Pasteur d'Alger. Ainsi que contre cinq isolats cliniques d'origine animale (Institut des sciences vétérinaires, université de Tiaret) soient : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogènes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Rhodotorula sp.*

III.1.1. Milieux de culture

Les milieux de cultures bactériennes utilisés étaient la gélose nutritive (GN), du bouillon nutritif (BN), la gélose Mueller-Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents antibiotiques et pour les levures, la gélose sabouraud.

III.1.2. Préparation de l'inoculum

❖ Bactéries

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture bactérienne de 18–24 heures, cultivée sur milieu gélosé et incubée à 37 °C, en mettant quelques colonies bactériennes en suspension dans une solution saline (0,9 % de NaCl) pour avoir un inoculum d'une densité équivalente au standard Mc Farland 0,5.

❖ Levures

Les mêmes opérations ont été effectuées avec les souches fongiques, mais dans ce cas le milieu de culture utilisé était le milieu Sabouraud

III.1.3. Préparation des solutions du miel

Des solutions de miel aux concentrations requises : 10%, 30% (v/v), 50% (v/v) et 70% (v/v), ont été préparées immédiatement avant chaque étape de notre étude. Tous les échantillons ont été alors incubés pendant 30 minutes à 37°C. L'incubation a été effectuée dans l'obscurité car le peroxyde d'hydrogène et la glucose oxydase du miel sont sensibles à la lumière (**White & Subers, 1964**).

III.2. Techniques d'étude du pouvoir antibactérien

Les techniques utilisées étaient celles de la diffusion sur gélose (méthode des puits, des disques, incorporation en gélose) ainsi que la technique de spectrophotométrie.

III.2.1. Techniques de diffusion en milieu solide

❖ Méthode des puits

De la gélose nutritive pour les bactéries et gélose sabouraud pour les levures (20 ml) coulées en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4mm, sontensemencées par écouvillonnage de la surface par la suspension bactérienne ou fongique, avec une densité de 10^7 UFC/ml. Les boîtes sont ensuite mises à sécher pendant 15 minutes à température ambiante. Des puits de 5 mm de diamètre espacés de 24mm centre à centre aménagés dans la gélose à l'aide d'une pipette, sont remplis de 0.1ml de miel à différentes concentrations, puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries, et 48 heures pour les levures. L'action du miel se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits. L'activité antibactérienne et antifongique du miel a été déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle transparente, le diamètre des zones d'inhibition. Les résultats sont exprimés

selon trois niveaux d'activité : résistant ($D < 5$ mm), intermédiaire ($11\text{mm} \geq D \geq 6$ mm) et sensible ($D > 12$ mm) (Couquet *al.*, 2013).

Les témoins négatifs sont préparés dans des puits rempli de 0,1 ml d'eau distillée stérile .

❖ Méthode des disques

Des disques de papier buvard stériles de 5 mm de diamètre mis à imbiber pendant 10 minutes, de miel aux mêmes concentration que précédemment, sont déposés à la surface des boîte de gélose (quatre disque par boîte), les disques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre, ensuite les boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries, et 48 heures pour les levures. Après incubation, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile. Le diamètre du halo est mesuré à l'aide d'une règle transparente et exprimé en millimètre. (Akujobi *et al.*, 2010).

❖ Technique du spectrophotomètre (Pourcentage d'inhibition)

Dans une éprouvette, 0.2 ml de suspension bactérienne et fongique sont inoculées dans 4 ml de miel aux concentrations requises. L'inoculation de 4 ml de volume de bouillon nutritif avec 0.2 ml de la suspension bactérienne et fongique en absence de miel a fait office de témoin. Avant incubation (t_0), la densité optique est mesurée à 620 nanomètre à l'aide d'un spectrophotomètre. Les cultures sont incubées pendant 24 heures dans l'obscurité à 37°C. Après 24 heures d'incubation, la densité optique est (t_{24}) de nouveau mesuré.

L'inhibition de la croissance pour chaque dilution est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage inhibition (\%)} = 1 - (\text{DO}_{\text{test}} / \text{DO}_{\text{control}}) \times 100$$

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = (\text{DO}_{\text{test}} / \text{DO}_{\text{control}}) \times 100$$

DO : Densité Optique

DO_{test} : Densité optique ($t_{24}-t_0$) (dilution de miel)

DO_{control} : Densité optique ($t_{24}-t_0$) (bouillon nutritive)

III.2.2. Détermination des CMI par la méthode d'incorporation

Nous avons déterminé l'effet antimicrobien des miels, par l'estimation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est la concentration du miel qui empêche d'une façon complète la croissance.

Cette méthode consiste à incorporer des volumes croissants du miel à une série de milieux de culture de manière à obtenir pour chaque lot 5 ml du volume du milieu.

Dans des conditions d'asepsie, la quantité du miel à tester est mise dans un tube à essai et maintenu pendant 1 minute dans un bain-Marie réglé à 50°C pour éviter la solidification du milieu de culture.

Le calcul des volumes du miel est fait comme suit:

$$\begin{array}{l} 5 \text{ ml (volume total)} \longrightarrow 100\% \text{ (miel + gélose)} \\ Y \text{ ml du miel} \longrightarrow X \% \text{ du miel.} \end{array}$$

Le milieu de culture doit être liquéfié et refroidi à une température de 50°C pour éviter la destruction des enzymes du miel. L'homogénéisation avec le milieu de culture est faite à l'aide d'un Vortex, en suite on coule les mélanges en boîtes de Pétri stériles et on laisse solidifier sur une surface froide.

❖ **Ensemencement :**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- ❖ **Incubation :** Les boîtes de Pétri sont placées en position renversée dans un incubateur réglé à une température de 37°C pendant 24 pour les bactéries et 48 heures pour les levures.

❖ Lecture :

A la fin de l'incubation, on note s'il y a croissance ou absence de colonies.

III.2.3. Détermination de la concentration minimale d'inhibition Additive (CMIA)**❖ Principe :**

L'inhibition additive est la concentration du miel associé à une concentration d'empois d'amidon à partir desquelles il s'effectue *in vitro* une inhibition complète des germes testés. Cette dernière serait plus faible que la CMI.

❖ Méthode et conditions expérimentales :

Cette méthode consiste à incorporer des volumes croissants d'une solution d'amidon à des quantités décroissantes de la valeur de la CMI du miel de telle sorte que le mélange miel et la solution d'amidon et la gélose soit égal à 5 ml.

Les concentrations inhibitrices additives sont les concentrations en miel et en amidon pour lesquelles il n'y a aucune croissance visible des souches testées.

Dans des conditions d'asepsie la méthode de préparation de l'empois d'amidon prend les étapes suivantes:

- Mesurer 100 ml de l'eau distillée à l'aide d'une éprouvette, la mettre dans une fiole.
- Peser 10g de poudre d'amidon par la balance analytique, ajouter de l'eau distillée et homogénéiser la solution (l'amidon avec l'eau distillée).
- Couvrir la fiole par un papier d'aluminium et la chauffer dans le four à micro-onde jusqu'à l'ébullition. Le mélange devient visqueux et translucide au cours du chauffage.
- Préserver cette fiole dans l'étuve à 37°C

III.2.3.1. Addition de l'empois d'amidon au miel

➤ **Méthode et conditions expérimentales :**

La manipulation s'effectue dans des conditions d'asepsie.

- A l'aide des seringues graduées stériles, introduire des volumes en miel inférieurs à la CMI dans des tubes à essai stériles.
- Ajouter des volumes précis d'empois d'amidon à des concentrations décroissantes de miel.

➤ **Incubation :**

L'incubation de mélange (miel et l'empois d'amidon), dans des tubes à essai stérile Après l'étiquetage, incuber les tubes à essai dans une étuve réglée à une température de **37°C** pendant :

- 24heures (Bactéries)
- 24 à 48 heures (*C. albicans* et *Rhodotorula sp.*)

III.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : Antibiogramme standard.

L'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les recommandations de la **CA- SFM (2010)**.

Les disques d'antibiotiques utilisés sont : Pénicilline 10 mg (P) ; Oxacilline 5 mg (OX) ; Erythromycine 15 mg (E) ; Gentamycine 10 mg (GN) ; Chloramphénicol 30 mg (C) ; Ampicilline 10 mg (AMP) ; Tétracycline 30 mg (TE) ; Tobramycine 10µg (TBO)

❖ **Milieux de culture**

- Gélose Mueller Hinton (MH) simple pour les bactéries non exigeantes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et MH additionnées à 5% sang de mouton pour *Streptococcus pyogenes* (bactérie exigeante), coulée en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

❖ Préparation d'Inoculum

- A partir d'une culture pure de 18H sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.
- **Ensemencement**
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

❖ Application des disques d'antibiotiques

On place sur la surface de la gélose les différents disques d'ATB choisis espacés de 24mm, centre à centre.

➤ Incubation

24 heures à 37°C.

➤ **Lecture**

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée pour les bactéries non exigeantes.

Les boîtes ouverte et bien éclairée pour *S. pyogène*.

- Les résultats ont été traités par le logiciel WHONET 5.0 (World Health Organization)
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : **Sensible**, **Intermédiaire** ou **Résistante**.

❖ **Produits antifongiques témoins**

Antifongiques témoins utilisés : Ketoconazole 2% et la Nystatin (100 UI), solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

III.4. Traitement statistique :

L'analyse statistique des données par le test de Chi² de Pearson été réalisés sur le logiciel Statistica 7.0 par une comparaison entre l'activité diastasique et la concentration minimale inhibitrice additive par une comparaison a une référence internationales).

* significatif à 0,05

** significatif à 0,01

*** significatif à 0,001

Résultats & Discussion

III. Tests d'activités antimicrobiennes par diffusion en milieu gélosé

Les résultats de l'évaluation antibactérienne et antifongique des miels à différentes concentrations sont repris ci-dessous (**Tableau 1-6**). Dans ces tableaux sont incluses les valeurs en (mm) des diamètres d'inhibitions, représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes détruits sous l'action du miel.

Tableau 1 :		Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels									
		<i>Streptococcus pyogenes</i>									
		Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions en (mm)									
Méthodes		Puits					Disques				
Concentrations		Pur	10%	30%	50%	70%	Pur	10%	30%	50%	70%
M1		39	ND	25	25	20	20	ND	5	19	ND
M2		44	ND	30	25	32	32	ND	ND	17	16
M3		39	ND	27	25	31	31	ND	14	20	18
M4		41	ND	29	20	33	27	ND	14	17	19

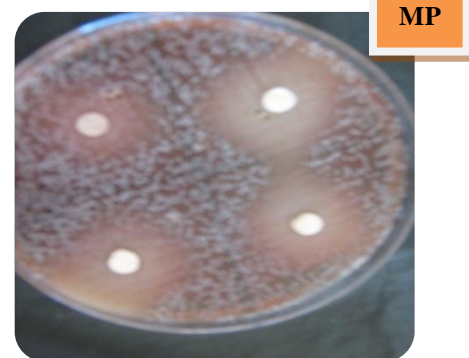


Tableau 2 :		Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels									
		<i>Staphylococcus aureus</i>									
		Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions en (mm)									
Méthodes		Puits					Disques				
Concentrations		Pur	10%	30%	50%	70%	Pur	10%	30%	50%	70%
M1		38	ND	ND	34	ND	40	ND	ND	34	ND
M2		40	ND	ND	38	ND	43	ND	ND	35	ND
M3		46	ND	ND	37	ND	41	ND	ND	38	ND
M4		36	ND	ND	37	ND	38	ND	ND	34	ND

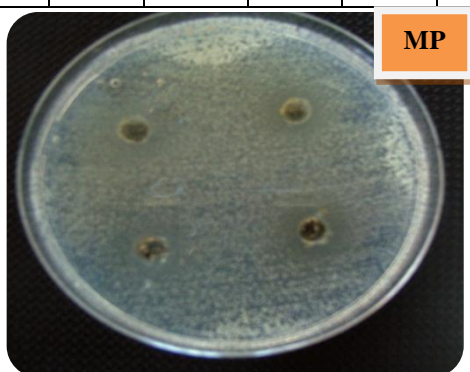


Tableau 3 :	Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels									
	<i>Escherichia coli</i>									
	Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions en (mm)									
Méthodes	Puits					Disques				
Concentrations	Pur	10%	30%	50%	70%	Pur	10%	30%	50%	70%
M1	38	ND	8	13	12	37	ND	ND	19	20
M2	31	ND	12	10	11	31	ND	ND	5	18
M3	35	ND	9	1	11	32	ND	ND	15	20
M4	34	ND	10	12	17	17	ND	ND	19	22



Tableau 4 :	Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels									
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
	Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions en (mm)									
Méthodes	Puits					Disques				
Concentrations	Pur	10%	30%	50%	70%	Pur	10%	30%	50%	70%
M1	27	8	ND	9	ND	22	ND	ND	33	ND
M2	30	10	ND	10	ND	16	ND	ND	30	ND
M3	30	7	ND	7	ND	22	ND	ND	28	ND
M4	26	ND	9	ND	9	17	ND	ND	25	ND

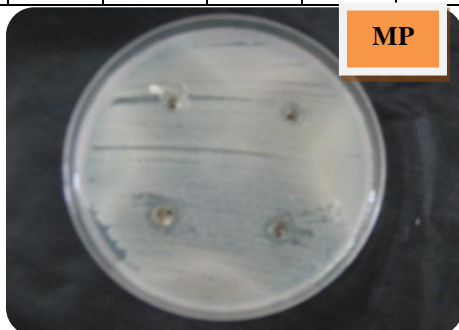


Tableau 5 :	Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels									
	<i>Rhodotorula sp.</i>									
	Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions en (mm)									
Méthodes	Puits					Disques				
Concentrations	Pur	10%	30%	50%	70%	Pur	10%	30%	50%	70%
M1	22	12	13	15	ND	9	8	9	13	ND
M2	20	11	10	14	ND	8	8	8	10	ND
M3	23	10	10	18	ND	10	7	11	10	ND
M4	14	10	8	17	ND	8	7	9	7	ND

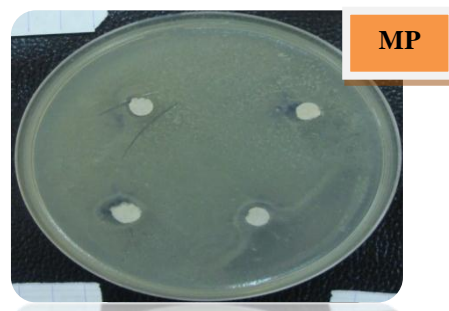
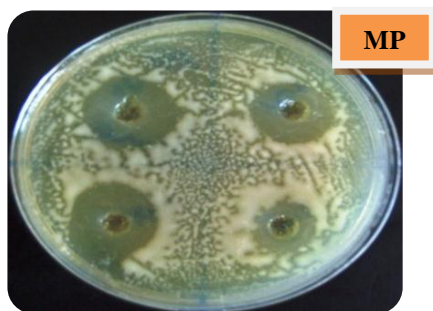
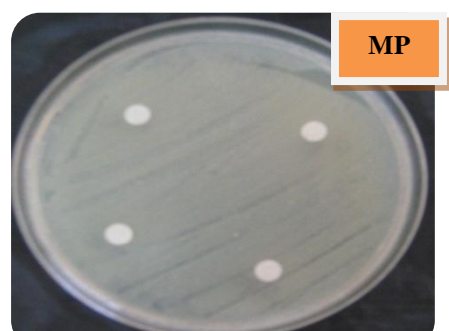
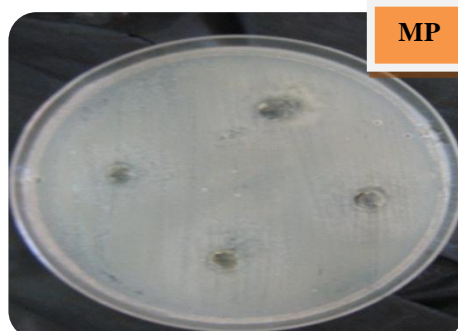


Tableau 6 :	Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels									
	<i>Candida albicans</i>									
	Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions en (mm)									
Méthodes	Puits					Disques				
Concentrations	Pur	10%	30%	50%	70%	Pur	10%	30%	50%	70%
M1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND



MP : Miel pure

ND : non détecté

NB : pour chaque souche testée le diamètre d'inhibition correspond à la moyenne de 3 manipulations

III.1. Diamètres d'inhibition (mm)

❖ Bactéries

Les résultats des tests de sensibilité sont consignés dans les **Tableaux 10, 11,12 et 13**.

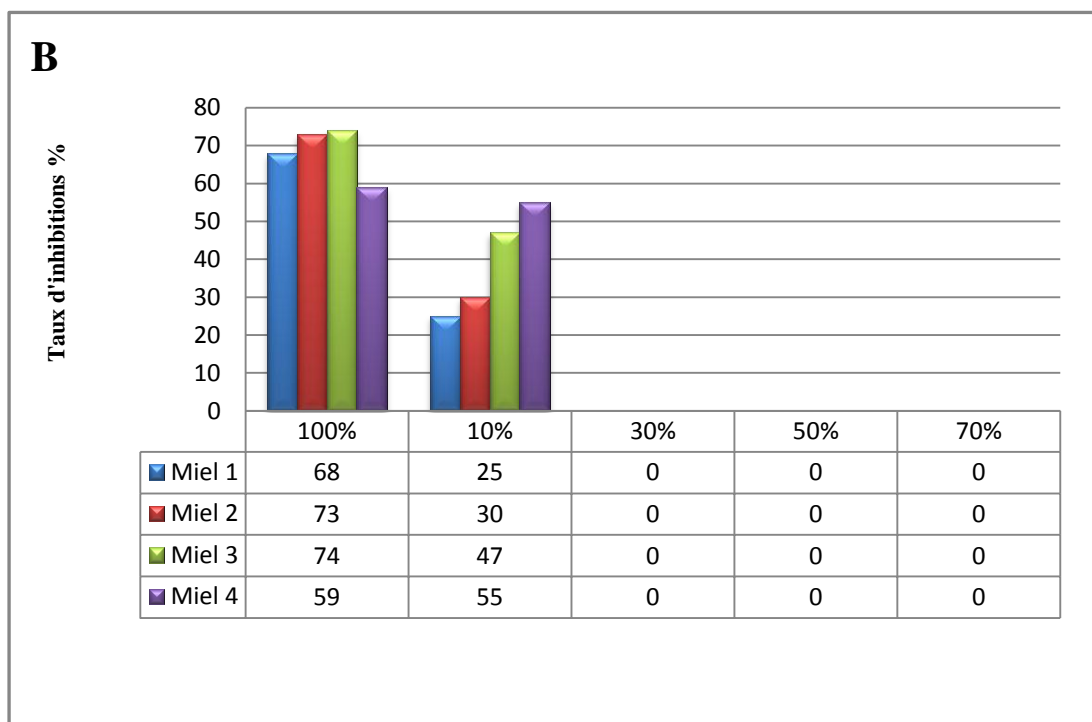
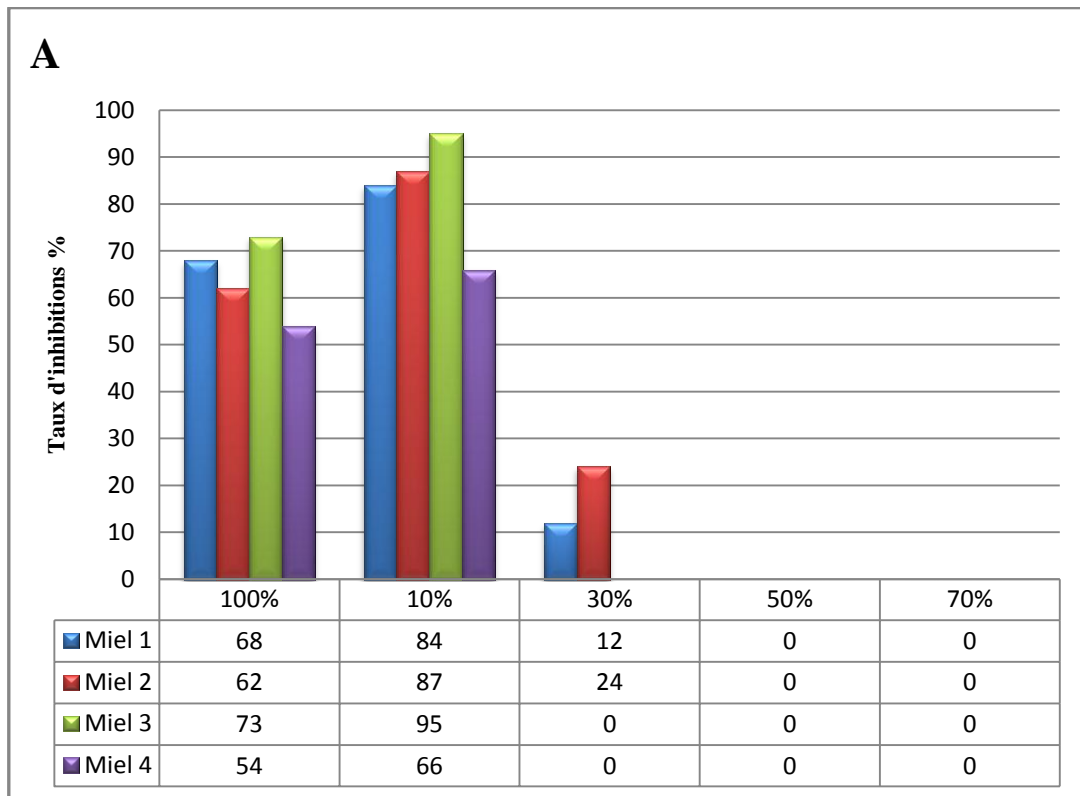
L'analyse de ces résultats montre que les zones d'inhibition sont plus prononcées pour les miels purs par rapport aux miels dilués. En fonction du diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne, les différentes bactéries ont été classées : "sensibles" si la zone d'inhibition est supérieure à 12 mm, "modérément sensibles" si elle est comprise entre 6 et 11 mm, "résistantes" si elle est inférieure à 5 mm (**Couquet *al.*2013**). Il est à noter que les zones d'inhibition pour ce qui est du miel pur est dans tous les cas >20 avec des moyennes de 34,25 ; 35,25 ; 28,12 et 23,75 mm vis-à-vis de *S. pyogenes*, *S.aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement. Celle des miels dilués se situe entre 1 et 38 mm avec une moyenne de 21.58.

❖ Levures

Les valeurs des zones d'inhibition (en mm) obtenues sont indiquées dans les **tableaux 14 et 15**. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre 7 à 23 mm. Globalement, la souche la plus sensible était *Rhodotorula sp.* Cependant, *C. albicans* s'est avérée résistante.

III.2. Tests d'activité antimicrobienne par la méthode spectrophotomètre (Taux d'inhibition (%))

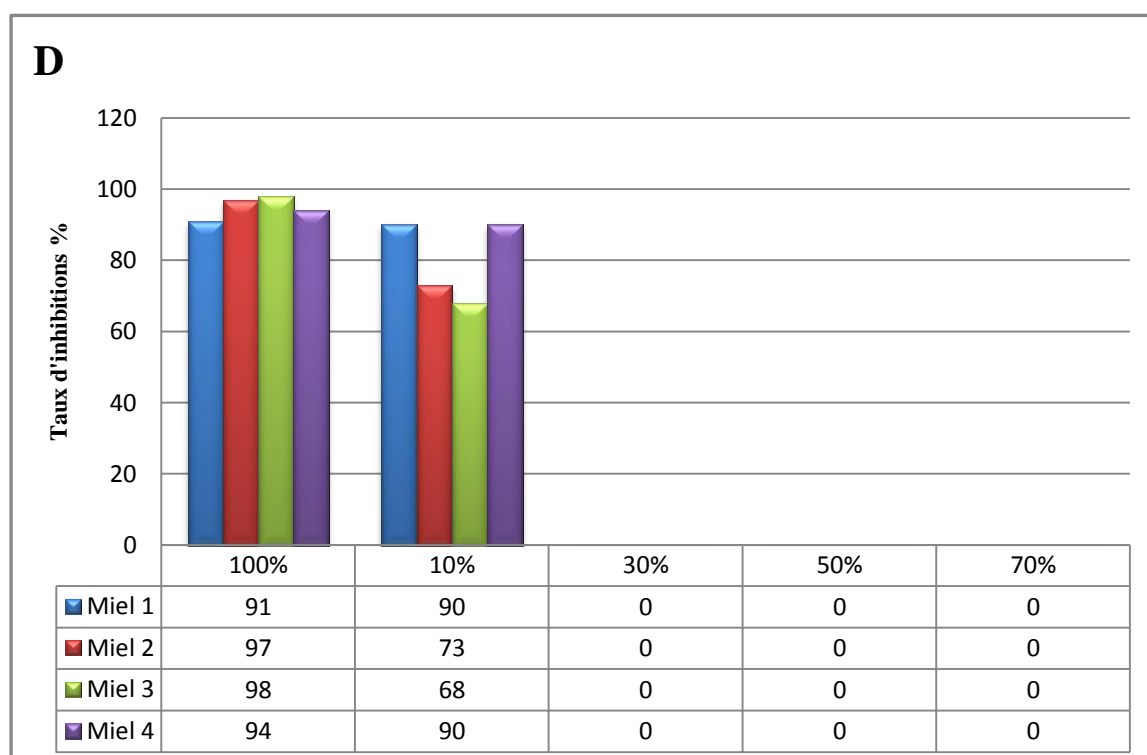
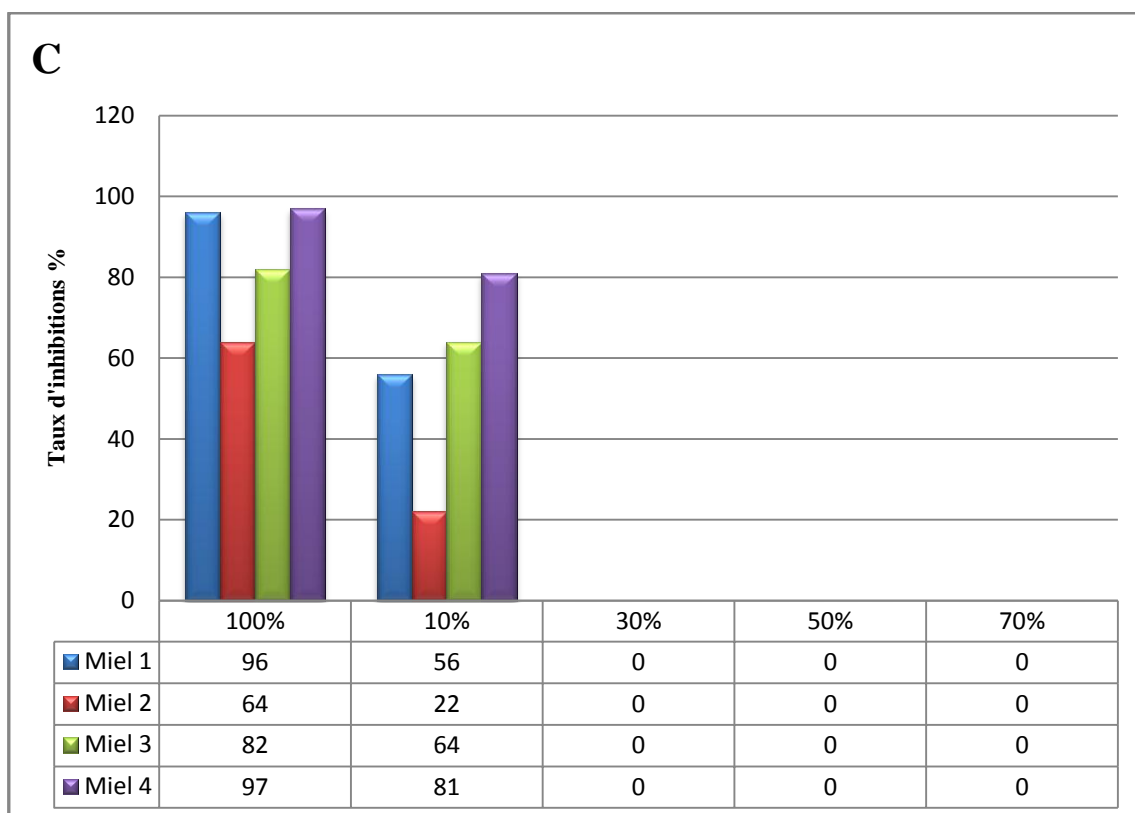
Les résultats sont consignés dans le tableau **A, B, C, D, E et F**. Nos résultats montrent que les miels inhibent les germes testés à des degrés divers avec des pourcentages d'inhibition variant entre 5,65 et 100%. Le degré d'inhibition variant en fonction du miel utilisé, du degré de dilution et de la souche testée.



NB : pour chaque souche testée le diamètre d'inhibition correspond à la moyenne de 3 manipulations

Figure A : Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *S.aureus*

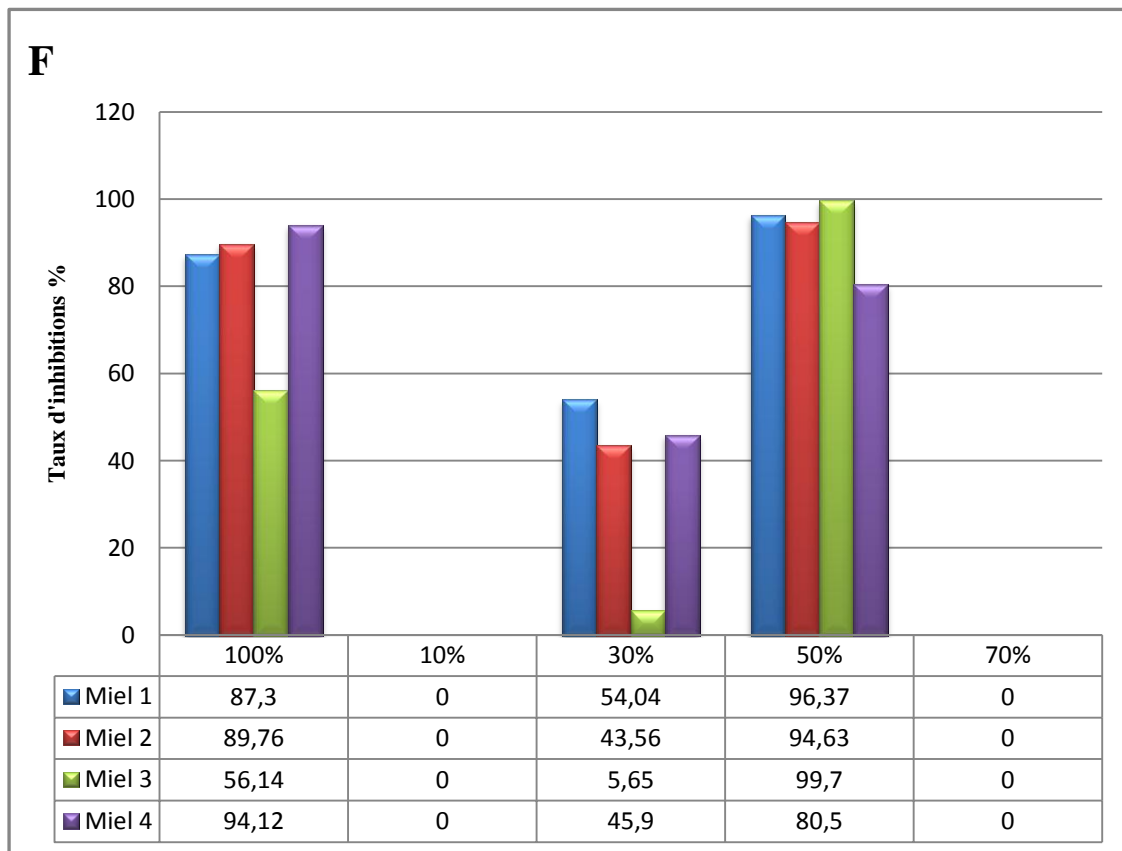
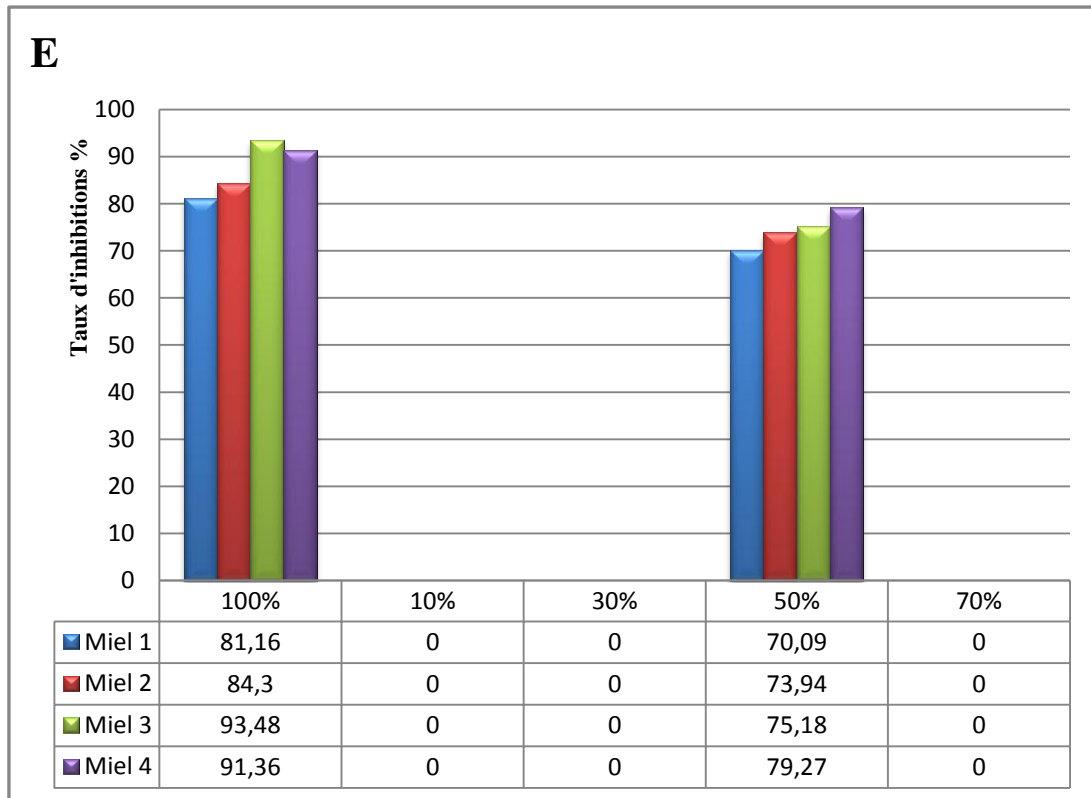
Figure B : Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *S.pyogenes*



NB : pour chaque souche testée le diamètre d'inhibition correspond à la moyenne de 3 manipulations

Figure C : Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *E.coli*

Figure D : Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *P. aeruginosa*



NB : pour chaque souche testée le diamètre d'inhibition correspond à la moyenne de 3 manipulation **Figure E** : Moyenne des taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *C.albicans*

Figure F : Moyenne des taux inhibitions (%) des miels vis-à-vis de *Rhodotorula sp*

❖ Les cocci à Gram positif

Les résultats des tests d'inhibition des deux souches de *S. pyogènes* et de *S. Aureus* montrent que le miel pur est doué d'une forte activité antibactérienne avec des taux d'inhibition allant de 54 à 73 % pour *S.aureus* et de 59 et 74% pour *S. pyogènes* respectivement. Les valeurs des taux d'inhibition obtenues grâce aux miels dilués sur *S. pyogènes* et *S. aureus* étaient de 0 à 55% et 12 à 95% respectivement.

❖ Les bacilles à Gram négatif

Les taux d'inhibition les plus élevés ont été observées avec *P. aeruginosa*, avec un taux moyen de 70,25%. *E.coli* s'était montré moins sensible que *P. aeruginosa* avec un taux moyen de (87,62%).

❖ Les levures

Si l'on considère l'ensemble des résultats, il ressort que certains miels dilués sont pratiquement inactifs sur les souches testés. En effet, *C.albicans* s'est révélée résistante aux miels dilués aux concentrations de : 10,30 et 70%). Quant au *Rhodotorula sp* elle est insensible aux miels dilués à 10 et 70%. Pour les concentrations 100% et 50% le miel inhibe *C.albicans* avec des taux allant de 70 ,09 % à 93,48% et de 5,65% à 99,7 % pour ce qui est de *Rhodotorula sp*

III.3. Effet additif de l'amidon sur l'activité antimicrobienne du miel

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale inhibitrice additive (CMIA) de chaque miel sur différents micro-organismes a été réalisée par la méthode en milieu solide (incorporation en gélose). Ce test a été effectué sur trois bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *K.pneumoniae* et *P.aeruginosa*), et sur deux levures (*C. albicans* et *R.mucilaginoso*). Les valeurs des CMI, CMIA et la Chute du CMI sont consignées dans les **Tableaux 7,8 et 9**.

III.3.1. Amidon de pomme de terre

Tableau 7 :	Effet additif de l'amidon de pomme de terre sur l'activité antibactérienne vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> et <i>K.pneumoniae</i>					
	<i>K.pneumoniae</i> ATCC 27736			<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853		
Echantillons	CMI %	CMIA%	Chute du CMI	CMI%	CMIA%	Chute du CMI
M5	14	12	14.28	12	10	16.66
M6	16	08	50	12	10	16.66
M7	22	20	09.09	16	15	06.25
M8	24	20	16.66	14	12	14.28
M9	18	17	05.55	12	11	08.33
M10	14	12	14.28	12	10	16.66
Amidon	ND	-	-	ND	-	-

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice; CMIA: Concentration Minimale Inhibitrice Additive

ND : non détecté

NB : pour chaque souche testée le diamètre d'inhibition correspond à la moyenne de 3 manipulations

III.3.1.1. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

❖ Pour les bactéries à Gram négatif

Nos six variétés de miels étudiés ont montré un effet antibactérien vis-à-vis de *P. aeruginosa* et de *K.pneumoniae*.

-Pour *P. aeruginosa* les CMI ont été de:12% à16% soit une moyenne de 13%. Et pour *K.pneumoniae* de 14% à 22%soit une moyenne de18% On constate que l'effet antibactérien est légèrement plus marqué sur *P. aeruginosa* que sur *K.pneumoniae*.

III.3.1.2. La concentration minimale d'inhibition additive (CMIA)

Il existait un effet additif entre le miel et l'amidon de pomme de terre pour ce qui est de nos six échantillons de miels étudiés, que ce soit vis-à-vis de *P.aeruginosa* ou *K.pneumoniae*. Cet effet additif est dû à l'effet combiné du miel et de l'amidon.

Les CMIA vis-à-vis de *P.aeruginosa* pour les six échantillons de miels ont été par ordre décroissant d'effet de:10% (M 5,6 et 10), 11% (M 9), 12% (M 8), 15% (M 7) soit une moyenne de 11,33%. Les gains en miel ont été: 16.66% (M 5,6 et 10), 14,28% (M 8), 8,33% (M 9) et 6,25% (M 7) soit une moyenne de 13,14%

Et pour *K.pneumoniae* de 8% (M 6), 12% (M 5 et10), 19% (M 9), 20% (M 7 et 8) soit une moyenne de 14,83%. Les gains en miel ont été: 50% (M6), 16,66% (M 8), 14,28% (M 5 et 10) et 9,09% (M 7) et 5,55 (M9) soit une moyenne de 18,31%.

III.3. 2. Amidon de Curcuma

Echantillons	Effet additif de l'amidon de Curcuma sur l'activité antibactérienne vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> et <i>E.coli</i>					
	<i>E.coli</i> ATCC 25922			<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853		
	CMI %	CMIA%	Chute du CMI	CMI%	CMIA%	Chute du CMI
M5	16	12	25	12	11	8.33
M6	14	12	14.28	12	11	8.33
M7	20	18	12	16	15	6.25
M8	16	14	12.50	14	13	7.14
M9	16	14	12.50	12	11	8.33
M10	10	09	10	12	11	8.33
Amidon	ND	-	-	ND	-	-

Echantillons	Effet additif de l'amidon de Curcuma sur l'activité antifongique vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> et <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		
	CMI %	CMIA%	Chute du CMI	CMI%	CMIA%	Chute du CMI
M5	40	38	5	28	26	7.14
M6	40	34	15	30	24	20
M7	50	40	20	36	32	11.11
M8	48	38	20.83	34	28	17.64
M9	40	32	20	30	26	13.33
M10	40	38	5	30	28	6.66
Amidon	ND	-	-	ND	-	-

ND : non détecté

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice; CMIA: Concentration Minimale Inhibitrice Additive ;

III.3.2.1. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

❖ Effet antibactérien

Les CMI vis-à-vis de *E.coli*, pour les six échantillons de miels ont été par ordre décroissant d'effet de:10% (M 6), 14% (M 2), 16% (M 1,4 et 5) et 20% (M 3) soit une moyenne de 13,66%. Et pour *P. aeruginosa* de 12% (M 5, 6,9 et 10), 14% (M 8) et 16% (M 7), soit une moyenne de 13%

❖ Effet antifongique

Les résultats émanant de test de l'activité antifongique des différents échantillons de miels vis-à-vis des souches de *C. albicans* ATCC 10231 et de *R.hodotorula sp.* par la méthode d'incorporation sur gélose ont montré que tous les miels possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis des deux levures testées. Les CMI vis-à-vis de *C.albicans* ont été par ordre décroissant d'effet de:40% (M 5, 6,9 et 10), 48% (M 8) et 50% (M 7) soit une moyenne de 43%. Et pour *Rhodotorula sp* de28% (M 5), 30% (M 6, 9 et 10), 34% (M 8) et 36% (M 7), soit une moyenne de 13%

III.3.2.2. La Concentration Minimale Inhibitrice Additive (CMIA)

Il existait un effet additif entre le miel et l'amidon de curcuma pour ce qui est de nos six échantillons de miels étudiés, que ce soit vis-à-vis de *P.aeruginosa*, *E.coli*, *C.albicans* ou *Rhodotorula sp.*Cet effet additif est dû à l'effet combiné du miel et de l'amidon.

❖ Effet antibactérien

Les CMIA vis-à-vis de *E.coli* ont été par ordre décroissant d'effet de:9% (M10), 12% (M 5 et 6), 14% (M 8 et 9) et 18% (M 7) soit une moyenne de 13,16%. Les gains en miel ont été: 25% (M 5), 14,28% (M 6), 12,5% (M 8 et 9) et 10% (M 10) soit une moyenne de 11,04%.

Et pour *P. aeruginosa* les CMIA ont été par ordre décroissant d'effet de:11% (M5, 6,9 et 10), 13% (M 8) et 15% (M 79) soit une moyenne de 12%. Les gains en miel ont été: 8,33% (M5, 6,9 et 10), 7,14% (M 8) et 6,25% (M 7) soit une moyenne de 7,78%.

❖ Effet antifongique

Les CMIA vis-à-vis de *C.albicans* ont été par ordre décroissant d'effet de:32% (M9), 34% (M 6), 38% (M 10,6 et 5) et 40% (M 7) soit une moyenne de 36.66%. Les gains en miel ont été: 20,83% (M 8), 20% (M 9 et 7), 15% (M 6) et 5% (M 10 et 5) soit une moyenne de 1263%.

Et pour *Rhodotorula sp.* les CMIA ont été par ordre décroissant d'effet de:24% (M6), 26% (M 9 et 5) ,28%(M 8 et 10) et32% (M 7) soit une moyenne de 23%. Les gains en miel ont été: 20% (M6), 17,64% (M 8), 13,33 % (M9), 11,11%(M 7), 7,14% (M5), 6,66%(M 10) soit une moyenne de 7,5%.

❖ Profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries testées

Tableau 10 :	Diamètre de zones d'inhibition en millimètre (mm) des antibiotiques vis-à- vis des germes testés.				
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.pyogène</i>	<i>K.pneumoniae</i>
Gentamicine (GN)	S	I	S	S	S
Pénicilline G (PNC)	R	R	-	-	-
Ampiciline (AMP)	R	R	R	R	R
Tétracycline (TE)	-	-	R	R	-
Oxacilline (OX)	R	R	R	R	-
Tobramicine TOB	S	S	S	S	-
Erythromycine(E)	S	I	R	R	R
Chloramphenicol(CHL)	I	S	-	-	-

S : Sensible ;I : Intermédiaire :R : Résistante.

La sensibilité et la résistance des bactéries testées aux différents antibiotiques sont reportées dans le **tableau 10**. On observe que les différentes souches de bactéries étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés,cet effet est bien inférieur à celui des miels.

- ❖ Les souches (*E.coli* ;*P.aeruginosa* ;*S.aureus* ;*S.pyogène* et *K.pneumoniae*) se révèlent les plus résistantes à *Oxacilline* et *Ampiciline* cela est lié à leur grande capacité à

développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, d'où leur implication fréquente dans les infections hospitalières.

- ❖ *S.aureus* et *S.pyogène* se révèlent les plus résistantes à Tétracycline
- ❖ *E.coli* ; *S.aureus* ; *S.pyogène* et *K.pneumoniae*) se révèlent les plus sensibles à Gentamicine
- ❖ *E.coli* ; *P.aeruginosa* ; *S.aureus* et *S.pyogène*) se révèlent les plus sensibles à Tobramicine
- ❖ *P.aeruginosa* elle s'est montrée sensible à Chloramphenicol
- ❖ *C.albicans* et *Rhodotorula sp.* se révèlent les plus résistantes à Ketoconazole 2% et la Nystatin

III.4.Discussion

L'efficacité du miel dans le traitement antimicrobien n'est plus à démontrer. Ce fait a été étayé par un grand nombre d'études scientifiques et d'essais cliniques. Dans les trente dernières années bon nombre d'études explorant l'activité antimicrobiennes *in vitro* du miel sur plus de 100 espèces ont été publiées, mettant en exergue son large spectre d'action vis-à-vis des bactéries et des champignons pathogènes.

Dans cette partie de notre étude des miels à l'état pur et dilués ont été testés par quatre méthodes différentes pour leurs activités antimicrobiennes sur *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E.coli*, *S.aureus*, *S. pyogenes*, *C.albicans* et *Rhodotorula sp.* Ces échantillons ont montré une activité inhibitrice sur les microorganismes testés, mais à des degrés différents en fonction de la variété de miel, du degré de dilution et de la méthode utilisée.

P. aeruginosa est certainement l'espèce la plus fréquemment rencontrée en pathologie infectieuse (Bremer, 2014). Elle se place parmi les agents étiologiques majeurs impliqués dans les infections nosocomiales. Une enquête multicentrique menée aux États-Unis par le centre national des infections nosocomiales indiquait qu'entre 1990 et 1992, *P.aeruginosa*

était le deuxième bacille à Gram négatif et le cinquième agent pathogène en fréquence (**Cabrolier et al., 2014**). Les résistances acquises sont très fréquentes chez *P. aeruginosa* et touchent les trois principales familles d'antibiotiques utilisées contre cette bactérie : bêtalactamines, aminoglycosides et fluoroquinolones (**Carpentier et al., 2003**). Les résistances sont parfois associées pour une même souche (**Cavallo et al., 2001**). Elle représente une cause majeure de mortalité chez les grands brûlés (**Berche et al., 1988**). Dans ce dernier cas en particulier, le miel serait d'un grand secours, car en plus de son effet antibactérien et antioxydant, c'est un outil de choix dans la cicatrisation des plaies. De plus le risque majeur chez les grands brûlés est la septicémie qui intervient dans un tiers des cas; même sous traitement, causant ainsi une mortalité élevée (75% environ) (**Stone and Martin, 1969**).

Dans notre étude les zones d'inhibition obtenues s'étaient situées entre 7 à 33mm en ce qui concerne *P. aeruginosa* ce qui est supérieur aux zones critiques de sensibilité de cette bactérie aux B- lactamines, Aminoglycosides, Quinolones et Polypeptides testés sur la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 (**Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Vétérinaire, 2008**). En accord avec nos résultats cette sensibilité de *P. aeruginosa* au miel a été mise en évidence par bon nombre d'auteurs (**Cooper et al., 2014 ; Al-waili et al., 2013**).

Klebsiella pneumoniae est parmi les bactéries gram-négative les plus reconnues médicalement comme pathogène important, et est de nature opportuniste qui plus est (**Wen-Chien Ko et al., 2002**).

La majorité des infections à *K. pneumoniae* sont acquises à l'hôpital provoquant une infection des voies urinaires, bactériémie, pneumonie nosocomiale, diarrhée et l'infection intra-abdominale (**Podschun et Ullmann, 1998**). Le spectre étendu bêta-lactamase (BLSE) contribue à sa résistance aux multiples médicaments.

Giske et al., (2008) a souligné que la *K. pneumoniae* est résistante la troisième génération de céphalosporine notamment la ceftizoxime, la céfotaxime, la ceftriaxone et la ceftazidime. Comparativement à *P.aeruginosa* peu d'études ont été réalisées sur l'effet du miel vis-à-vis de *K. pneumoniae*.

K. pneumoniae est sensible au miel (**Al-waili et al., 2013**), dans certains cas et en fonction de l'origine botanique du miel à des dilutions aussi basse que 0,25% (**Molan ,1992**).

D'après **Braide et al., (2012)** *K.pneumoniae* est moins sensible au miel que *P.aeruginosa*. Nos résultats sont plus mitigés et semblent dépendre de l'origine botanique du miel. *E.coli* est un bacille à Gram négatif de la famille des entérobactéries, hôte commun de la microflore commensale du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud tel que les mammifères et les oiseaux. Certaines souches d'*E.coli* sont responsables de pathologies diverses chez l'homme ou l'animal ; les plus fréquentes sont des diarrhées (*E.coli* entérotoxinogènes (ETEC) des gastro-entérites *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) ou des infections urogénitales. (UPEC). Selon le rapport fournit par l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (**ONERBA**) en 2006, le taux de résistance par BLSE des souches d'*E.coli* dans la communauté était de 1,1%.

Blair et al., (2009), ont étudiés *in vitro* le potentiel antibactérien du miel sur *E.coli*. Il a démontré que la croissance d'*E.coli* était inhibée lorsque l'on ajoute du miel (à des concentrations de 6,3% à 8,5%) au milieu de culture. **Hyslop et al.,1995** ont montré que la croissance de souches *E.coli* exposées à des concentrations constantes de peroxyde d'hydrogène entre 0,25 et 0,25 mmol/L était sévèrement affectée et qu'à 1 mmol/L une bactériostatique complète était observé.

L'épidémiologie de la résistance chez *S. aureus* a été marquée ces dix dernières années, d'une part, par la communautarisation des *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) et d'autre part, par l'émergence de phénotypes de résistance aux glycopeptides (**Donnio, Gaschet, &**

Cady, 2010). Le miel a aussi été testé sur de souches *S. aureus* présentant des résistances aux antibiotiques. **Cooper et al., (2002)** ont réalisé une étude qui démontre l'efficacité *in vitro* du miel de Manuka et du miel pasteurisé sur une souche de *S.aureus* résistante à la Méthicilline. **Alandejani et al., (2009)** ont montré lors une étude *in vitro*, qu'à des concentrations de 50%, un miel de Sidr du Yamen et un miel de Manuka néo- Zélandais de qualité médicale (Convita®) avaient les effets bactéricides sur des biofilms préétablis de *S.aureus* sensible à Méthicilline,*S.aureus*résistante à la Méthicilline.

Al-waili et al., 2005 a mis en évidence dans une étude l'efficacité d'une préparation à base de miel, cire d'abeille et huile d'olive sur *S.aureus*. Il a démontré que la croissance d'*S.aureus* était inhibée à une concentration de 50 et 60 % de la préparation.

S. pyogenes (streptocoque de groupe A, β -hémolytique) est responsable de la majorité des angines bactériennes, qui nécessitent une antibiothérapie (β -lactamines et macrolides). *S. pyogènes* serait responsable de 10 à 25 % des angines chez les adultes et de 25 à 40 % chez les enfants. Chez ces derniers, le risque d'implication de *S. pyogenes* est maximal entre 5 et 15 ans (**Sfeir, 2013**).Parmi les nombreuses propriétés prêtées au miel, leur pouvoir antibactérien sur *S. pyogènes*, est fréquemment rapporté (**Hassanain et al.,2010 ;Srisayam and Chantawannakul ,2010**).Nos résultats, sont en accord avec ceux rapportés par la littérature (**Pimentel et al.,2013, Huttunen et al.,2012**).Nos tests montrent que le miel est très actif sur le *S. pyogènes*, (zones d'inhibitions ≥ 20) germe le plus incriminé au cours des angines rouges. De ce fait, nous pensons que son utilisation comme adjuvant du traitement antibiotique peut activer la guérison.

C.albicans, la levure commensale, opportuniste et pathogène chez les patients immunodéprimés dont la proportion ne cesse de croître ces deux dernières décennies, a suscité plus d'attention de la part des chercheurs. Cette attention a augmenté en raison de l'apparition de la maladie du SIDA, des transplantations d'organes, de la chimiothérapie dans

le traitement des cancers et de l'antibiothérapie ainsi que la corticothérapie prolongée (Odds, 1988). En effet, l'effet antifongique du miel *in vitro* a été rapporté par plusieurs auteurs Selon les travaux de Theunissen et al., (2001) et de Molan (1992), l'inhibition de la croissance de *C. albicans* est obtenue entre des concentrations de 1,6 à 100%.

Biswal et al., (2003) ont monté *in vivo* sur 40 patients adultes cancéreux, atteints de mycoses et de gingivites et traités au miel, une diminution significative des mycoses par rapport au groupe témoin (20% contre 75%). D'autre part la compliance au traitement pour les patients aidés par le miel fut meilleure que celle du groupe témoin.

Selon Molan (1992), la sensibilité des espèces bactériennes et fongiques ne saurait être comparée en se basant sur les résultats des différentes études, car les miels utilisés pourraient avoir de larges différences dans leurs activités antimicrobiennes. "Quand l'effet d'un miel ou d'un groupe de miels, sont testés sur un certains nombres d'espèces bactériennes et fongiques dans les mêmes conditions et dans une même étude, les sensibilités peuvent être comparées. En effet l'activité antimicrobienne du miel est bien connu être en fonction de son degré de dilution. Dans la méthode du puits, le miel diffuse de façon centrifuge dans le milieu de culture, alors que dans la méthode d'incorporation en gélose il est réparti d'emblée de façon homogène dans le milieu. Dans les applications thérapeutiques dans le traitement des plaies cela devra être pris en compte, si pour une quelconque bactérie la méthode des puits montre un effet antibactérien supérieur, donc le miel devra être déposé sur la plaie et non étalé. Si au contraire c'est la méthode d'incorporation en gélose qui montre un effet supérieur, donc le miel devra être étalé de façon homogène sur la plaie.

L'activité antimicrobienne du miel a été attribuées à différents facteurs comprenant la pression osmotique, le pH bas et la présence d'inhibines consistant en peroxyde d'hydrogène acides phénoliques flavonoïdes et lysozymes (Molan, 1992). Beaucoup ont attribués l'action thérapeutique du miel juste à l'effet osmotique du à sa teneur en sucres (Keast-Butler ,1980 ;

Somerfield, 1991; Condon, 1993). Cependant, le fait que les propriétés antimicrobiennes du miel sont augmentées lorsqu'il est dilué a été clairement observé et signalées depuis 1919 (**Braniki, 1981**).

Comme la dilution résulte en une diminution de la pression osmotique cette première théorie est très sujette à discussion, il en est de même pour le pH de par l'effet tampon entraîné par la dilution (**Molan, 1992**).

Prica (1938) a établi que des concentrations de 20% de miel avaient de fortes propriétés bactéricides, ce qui fut confirmé par **Ialomiteanu et Daghie (1973)**. Par contre, **White et Subers (1963)** ainsi que **James et al., (1972)** ont conclu que l'effet de miels à une concentration de 25% était plutôt bactériostatique que bactéricide. D'après **Allen et al., (2000)**, l'activité antibactérienne est principalement due au peroxyde d'hydrogène, produit continuellement quand le miel est dilué. D'un autre côté **Bang et al., (2003)**, ont clairement démontré que l'activité antibactérienne du miel augmente avec la dilution jusqu'à un maximum compris entre 40% et 60%, concentrations à laquelle la production du peroxyde d'hydrogène est maximale. D'après **Brudzynski, 2006**, l'activité antibactérienne du miel est corrélée à la production de peroxyde d'hydrogène qui peut être considérée comme un facteur prédictif de l'activité antibactérienne du miel. L'action du miel, en dehors du peroxyde d'hydrogène, est également liée, d'une part, à son pH bas (3,2 et 4,5) plus il est acide, plus il crée un milieu peu favorable à la prolifération bactérienne. Les acides organiques non dissociés dans le miel jouissent d'activités antimicrobiennes (**Ingram et al., 1956; Macris, 1975**) car très solubles dans les membranes des cellules (**Cramer et Prestegard, 1977**), ils pourraient provoquer des altérations dans la perméabilité cellulaire et dans la phosphorylation oxydative au niveau du transport des électrons (**Freese et al., 1973**).

A côté de ces propriétés, il faut également intégrer le rôle des polyphénols. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des

composés phénoliques. Ces composés du miel ont fait l'objet de plusieurs études ou ils ont été identifiés et leurs activités antimicrobiennes évaluées.

Weston & Brocklebank, (2000), ont montrés que les composés phénoliques contribuaient à l'activité antibactérienne des miels de *Leptospermum*, mais seulement de façon mineurs. D'après (**Ultee et al., 1999 ; Helander et al., 1998**) les composés phénoliques causent des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassiums, une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, une perturbation de la force proton motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires.

Il est difficile de comparer les résultats obtenues dans cette étude car ils proviennent de nombreux auteurs utilisant les miels d'origines florale et géographique variées, dont le mode de conservation est souvent inconnue et mettant en oeuvre les tests microbiologiques qui ne sont pas tous basés sur la même méthode. Mais, au vu de l'ensemble des résultats obtenue, on peut tout de même conclure que nos miels possèdent une activité inhibitrice remarquable *in vitro*.

Le miel contient des amylases, qui par hydrolyse de l'amidon contribueraient à une augmentation de l'osmolarité de l'ensemble, et donc de l'effet antimicrobien. L'hypothèse de départ était que l'hydrolyse de l'amidon par les amylases du miel entraîne la production de dextrines et de maltose et donc serait à l'origine d'une augmentation de l'osmolarité et donc de l'effet antimicrobien. Au vu des résultats on voit qu'il existait une action inhibitrice additive antimicrobienne entre le miel et les deux types d'amidon pour les 6 variétés de miels et pour les germes étudiés.

La présence de protéines affecte principalement les propriétés rhéologiques et l'aptitude des grains d'amidon à l'hydrolyse enzymatique (**Tara, 2005**). L'amidon de pomme de terre contient une fraction très minime par rapport aux autres plantes (0,05%), celui de maïs (0,3), il

en est de même pour les lipides, amidon de pomme de terre : 0,009 celui de maïs : 0,61-0,65 (**Duprat et al., 1980**). Les lipides affectent l'aptitude des grains d'amidon à l'hydrolyse enzymatique (**Massaux et al., 2006**). Plus la taille des granules est grande plus il offre prise à l'hydrolyse. Selon **Vercauteren et Rapaille (1999)** le diamètre moyen des granules d'amidon de maïs est de 3µm à 26 µm, alors que celui des granules d'amidon de pomme de terre est de 40 à 50 µm. Ces différents éléments pris ensemble expliquent très probablement cette corrélation. Cependant, l'amidon de pomme de terre contient une fraction importante de phosphate représentant de 0,06 à 0,1 % de matière sèche (**Palasinski, 1980**). Les sites de phosphorylation varient avec le génotype de l'amidon de pomme de terre (**Muhrbeck et Tellier, 1991**). Parmi les amidons l'amidon de pomme de terre, ceux à haute teneur en phosphore montre une plus grande résistance à l'hydrolyse (resistant starch) (**Absar et al., 2009**).

Donc pour tout usage médical éventuel selon le contexte de cette étude, il serait nécessaire de choisir des cultivars de pomme de terre à basse teneur en phosphore.

L'étude statistique à montrer qu'il n'existait pas de corrélation entre l'indice de diastase et l'effet additif entre le miel et l'amidon de curcuma. Cela pourrait confirmer le fait que l'activité antibactérienne et antifongique n'était pas due à l'augmentation de l'osmolarité. Cependant, cette corrélation existe en ce qui concerne l'amidon de pomme de terre.

Conclusion générale

&

Perspectives

La partie ouest de l'Algérie figure parmi les zones productrices de miels. La présente étude a permis d'obtenir des informations de base sur les ressources mellifères utilisées par les abeilles et les caractéristiques des miels produits. L'étude a été basée sur l'analyse pollinique ou melissopalynologie, propriétés physico-chimiques, pouvoir antioxydant et propriétés antimicrobiennes.

Parmi les 10 échantillons testés, 4 sont des miels unifloraux et 6 multifloraux. Les résultats des analyses polliniques démontrent la dominance des miels monofloraux de Jujubier, Citrus et d'Eucalyptus, avec des pourcentages de pollen variant respectivement de 48% à 87 % et de ainsi que des miels multifloraux. Ces différents miels caractérisent les régions de Tiaret, Saida, Relizen et Mascara. Les caractères physico-chimiques ont montré que ces miels répondent aux normes établies par le codex Alimentarius.

Notre intérêt s'est orienté aussi vers l'activité anti oxydante du miel dans le cadre de la recherche de nouveaux antioxydants d'origine naturelle, afin d'épargner l'utilisation des antioxydants synthétiques dont certains d'entre eux peuvent être toxiques .Les résultats que nous avons obtenus confirment le puissant potentiel antioxydant du miel. Cette importante activité à la fois antimicrobienne et antioxydante est due principalement aux polyphénols. Ce composé est très connu pour ses propriétés contre les agents microbiens et antioxydants. L'ensemble de ses résultats laisse entrevoir des perspectives de la recherche de formulation à base de miel à la place de certains antibiotiques ou antioxydants de synthèse dans le domaine de l'industrie pharmaceutique.

L'activité antimicrobienne du miel n'est plus à démontrer, cependant malgré la masse de publications scientifiques inhérentes au sujet, le mécanisme de cet effet n'est pas encore entièrement résolu. Les nombreuses contradictions qui existent entre les différents auteurs, ne devraient pas être dans une certaine partie imputable au mérite de tel ou tel étude.

En effet, d'une part le miel continue à montrer qu'il est une substance éminemment complexe, d'autre part, il est bien connu et démontré que l'activité thérapeutique du miel varie largement en fonction de son origine botanique et géographique, des conditions et de la saison de sa collecte, sa conservation, son conditionnement. Cette présente étude, met surtout en relief le mode d'application du miel sur les plaies, et l'amidon qui devrait être utilisés pour potentialiser son effet antimicrobien. Le miel étant une denrée de beaucoup plus chère que l'amidon, l'usage de l'amidon serait aussi d'un intérêt économique certain. Une étude plus poussée incluant une gamme de bactéries et levures assez large devrait être menée pour souligner dans quel type de plaie en regard du germe causal, cette association miel amidon est applicable. Pour terminer, le miel est non toxique non irritant, n'entraîne pas d'effets secondaires et permet d'éviter les désagréments de certains traitements lourds et astreignants physiquement, psychologiquement et économiquement.

Le 30 avril 2014, un nouveau rapport de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) – le premier portant sur la résistance aux antimicrobiens – révèle que cette grave menace n'est plus une prévision, mais bien une réalité dans chaque région du monde. Dans les universités les plus prestigieuses les recherches tendent à se focaliser sur une alternative basée sur les produits naturels. De par le monde, de nombreuses variétés de miels ont été homologuées et tiennent une place de premier rang dans la pharmacopée mondiale. Trouver des variétés de miels Algériens doués de propriétés thérapeutiques serait d'un grand intérêt non seulement sanitaire mais également économique.

Références

Bibliographiques

Absar N, Zaidul I.S.M, Takigawa S, et al. (2009). Enzymatic hydrolysis of potato starches containing different amounts of phosphorus. *Food Chem.* 112:57–62.

Afonso V, Champy R, Mitrovic D, et al. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine.* 74: 324-329.

Afonso A.S, Medeiros AS, Nunes C.S.et al. (2007). Florística da vegetação arbustiva aberta na Restinga da Marambaia, RJ. *Revista Brasileira de Biociências* vol. 5, p. 450-452.

Ai waili N.S. (2004a). Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions. *Medical Science Monitor*, 2004 b, 10 (8), 94-98.

Alandejani T, Marsan J, Ferris W, et al. (2009) Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *Otolaryngol Head Neck Surg.* 141(1):114-8.

Alexander in Makhloufi, (2003) L'apiculture d'aujourd'hui. 2^{ème} édition dargaud éditeur. PP 91-125.

Al ML, Daniel D, Moise A. et al. (2009) Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chem* 112: 863-867.

Ali A. T. M. M. (1997) Natural honey prevents ischaemia-reperfusion-induced gastric mucosal lesions and increased vascular permeability in rats. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9 (11): 1101-1107.

Aljadi A.M & Kamaruddin M.Y. (2004). Evaluation of the phenolic and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 513–518.

Allen K.L, Molan P.C, Reid G.M. (1991). A survey of the antimicrobial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43, 817–822.

Al-Mamary M, Al-Meer A Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of Yemeni honey. *Nutrition Research*, 22, 1041–1047.

Alvarez-Suárez J. M, Tulipani S, Romandini SET al. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health, a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 15–23.

AL-Waili N, Ghamdi A. A, Ansari M. J et al. (2013). Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of Medical Research.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.04.009>.

Al-Waili N.(2004). Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J Med Food* 2004;7:210e222.

Al-Waili N.S, Akmal M, Al-Waili FS, et al. (2005). The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. *Med Sci Monit.*;11:433– 438.

Al-Waili N.S, Saloom K.S, Al-Waili T.N, et al. (2006).The safety and efficacy of a mixture of honey, olive oil, and beeswax for the management of hemorrhoids and anal fissure: a pilot study. *Sci World J.* 6:1998–2005.

Al-Waili NS.(2005). Effects of honey on the urinary total nitrite and prostaglandins concentration. *Int Urol Nephrol* 2005;37:107e111.

Alzahrani HA, Alsabehi R, Boukraâ L,et al. (2012). Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules*, 17: 10540-10549.

Amaral S, Mira L, Nogueira JM, et al. M. (2009). Plant extracts with anti-inflammatory properties--a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorg Med Chem*. 17(5):1876–1883.

Amorowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, et al. (2004) Free radical scavenging capacity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* 84: 551–62.

Angelov T, Guainazzi A, Scharer OD. (2009). Generation of DNA interstrand cross-links by post-synthetic reductive amination. *Org Lett*. 2009;11:661–664.

Antolovic M, Prenzler P.D, Patsalides E.et al. (2002). K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002, 127, 183–198.

AOAC (1984) Official methods of analysis. 14th ed. Washington DC, Association of Official Analytical Chemists.

Audigie C. (1980): *Biochimie structurale*, édition: Doin, Paris. PP: 101-103.

Augustyniak A, Bartosz G, Cipak A, et al. 2010. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radic Res*, 44, 1216-1262.

Bacha H. C. (2003): Le miel entre le coran et la science, revue: *Al-iajaz Alilmi* n°: 15. PP: 6-11.

Baltrusaityte V, Venskutonis PR, Ceksteryte V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem*. 101:502–514.

Bang L. M, Bunting C, & Molan P. C. (2003). The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implication for wound healing. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9, 267–273.

Belostotskii N.I, Kas'ianenko V.I, Dubtsova E.A,et al. (2009). Influence of honey, royal jelly and propolis on accelerating acetate healing of experimental gastric ulcers in rats *Eksp Klin Gastroenterol*. (6):46-50.

Benzie I.F.F, Strain J.J (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76.

Berche P, Gaillard J.L & Simonet M. (1999). *Bactériologie : bactéries des infections humaines*. Edition Flammarion Médecine-Sciences, collection de la biologie à la clinique, Paris, 1988, tirage 1991, pp. 230-238.

Beretta G, Granata P, Ferrero M.et al. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/ fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 185-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>

Bertoncelj J, Dobersék U, Jamnik M, et al. (2007). Evaluation of the phenolic content antioxidant activity and color of Slovenian honey. *Food Chemistry* 105, 822–828.

Biri M, (1999). Le grand livre des abeilles. L'apiculture moderne. Edition vecchi S. A paris. 260 p.

Biswal B.M, Zakaria A, Ahmad N.M. (2003) Topical application of honey in the management of radiation mucositis: a preliminary study. *Supportive Care in Cancer* 11: 242–248.

Blair S.E, Cokcetin N.N, Harry E.J, Carter D.A. (2009) The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 28(10):1199-1208.

Bocquet M. (1997).Le miel d'Eucalyptus. Nature et composition, principales caractéristiques organoleptiques. *Bull Tech Apic* 24 : 151-2.

Bogdanov S (2002) Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products: pp 1-7.

Bogdanov S (2009) Honey technology. *Bee Product Science* online at www.beehexagon.net (3): 1-5.

Bogdanov S, Bieri K, Figar M et al. (1995) Kapitel 23 Bienenprodukte: 23A Honig. *Schweiz.Lebensmittelbuch* (11).

Bogdanov S, Bieri K, Gremaud G.et al. (2004a). *Swiss Food Manual: Pollen Bienenprodukte*, BAG (Swiss Federal Office for Public Health); Berne.

Bogdanov S, Gallmann P, Stangaciu S et al. (2006) Bienenprodukte und Gesundheit. *AlpForum* 41: 3-50.

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber et al. (2008) Honey for Nutrition and Health: A Review. *J.Am..Coll.Nutr.* 27: 677-689.

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R et al. (2006). Honey for nutrition and health: A review. *Am. J. Coll. Nutr.*, 27: 677-689.

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R et al. (2008) Honey for Nutrition and Health: A Review. *J.Am. Coll.Nutr.* 27: 677-689.

Bogdanov S, Lüllman C, Martin P et al.(1997). Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission. *Bee World*, 80 (2) : 61–69.

Bogdanov S, Martin P, Lüllmann C. (1997) – Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie* (extra issue): 1-59.

Bogdanov S, Matzke A (2003) Honig - eine natürliche Süsse, In Matzke, A; Bogdanov, S (eds) *Der Schweizerische Bienenvater, Bienenprodukte und Apitherapie*, Fachschriftenverlag VDRB; Winikon, Switzerland; pp 7-40.

Bogdanov S, Ruoff K. & Persano Oddo L. (2004 b). Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, 35: S4–S17.

- Bogdanov S. & Blumer P. (2001).** Propriétés antibiotiques naturelles du miel. *Revue Suisse d'Apiculture*, 98 (3) : 107-114.
- Bogdanov S. (1997).** Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel Wissencharnd und Technology*, 30, 748–753.
- Bogdanov S. (1999).** Stockage, Cristallisation et liquéfaction du miel. Centre Suisse de Recherche Apicole : 1-5.
- Bogdanov S. (2009).** Harmonised methods of the International Honey Commission, responsible for the methods: pp. 1–54.
- Bogdanov S. Bieri K. Gremaud G et al. (2004).** Swiss Food Manual: Gelée Royale Bienenprodukte, BAG (Swiss Federal Office for Public Health); Berne: 23-26.
- Bogdanov, S. (1997).** Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel Wissencharnd und Technology*, 30, 748–753.
- Bonte F, Desmouliere A.(2013).** Honey: origin and composition. *pharmaceutiques* 52 . 531 , p. 18-21.
- Bowen W. H, & Lawrence R. A. (2005).** Comparison of the cariogenicity of Cola, honey, cow milk, human milk, and sucrose. *Pediatrics*, 116, 921-926.
- Braide W, Oranusi S.U, Akaluka C.K et al.(2012).** Antibacterial efficacy of crude and diluted honey on four wound isolates. *global advanced research journal of microbiology*. 1(1), pp 001-004.
- Braniki F. J. (1981)** Surgery in Western Kenya. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 63: 348-352.
- Bremer E. (2014).**Liberate and grab it, ingest and digest it: the GbdR regulon of the pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 196:1 7-15. doi:10.1128/JB.01055-13.
- Brudzynski K, & Lannigan, R. (2012).** Mechansim of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. *Front. Microbiol.* 3:36.
- Brudzynski K, & Miotto D. (2010a).** The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chemistry*, 124, 869–874.
- Brudzynski K, Abubaker K, Miotto D. (2012)** Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: polyphenol/ H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chem.*; 133;329–336.
- Brudzynski K. (2006).** Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Can. J. Microbiol.* 52, 1228–1237.10.1139/w06-086.
- Burda S, Oleszek W. (2001).** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.* 49(6):2774-9.
- CA SFM (2010).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

- Cabroliera N, Lafoliea J, Bertrand X. (2014).** Epidemiology and risk factors of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal des Anti-infectieux*. 16:1; 8–12.
- Caillas A. (1947).** Les produits de la ruche: le miel, la cire, le pollen, 3^o Edition, Chez l'auteur, Bois d'Arcy.
- Caillas A. (1974).** La propolis, in *L'Abeille de France et l'Apiculteur*, Mars, 1974. P : 97-98.
- Carpentier J.P. (2013).** Infections à bacille pyocyanique. *Maladies infectieuses* p24.
- Castaldo S, Capasso F. (2002).** Propolis, an old remedy used in modern medicine. In *Fitoterapia.*, vol. 73, 2002, Suppl. 1, p. 1-6.
- Cavallo J.D, Leblanc F, Fabre R et al. (1999).** Survey of the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in France and the distribution of b-lactam resistance mechanisms: the GERPB study. *Pathol Biol* 2001; 49: 534–9.
- Cervantes M. A. R, Novelo-gonzalez S. A & Duch-sauri E, (2000).** Effect of the temporary thermic treatment of honey on variation of the quality of the same during storage. *Apiacta*, 35:162-170.
- Chakir A, Romane A, Marcazzan GL et al.(2011).** Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry* (2011), doi:10.1016/j.arabjc.2011.10.013.
- Chauvin R. (1968).** *Traité de la biologie de l'abeille*, Masson et Cie, éditeurs, Paris. PP : 66-81 et 277-319.
- Chen HY, Lin YC, Hsieh CL (2007)** Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chem* 104: 1418-1424.
- Clément M.C. (2002).** *Melissopalynologie en Nouvelle-Caledonie, importance des spectres polliniques dans la typification des miels.* Mém. E.P.H.E., 77 p.
- Codex Alimentarius Commission: (1993).** Revised Codex Standards for Sugars and Honey; CX 5/10.2; CL (1993)/14-SH; Via delle Terme di Caracalla, Rome
- Condon R.E. (1993)** Curious interaction of bugs and bees. *Surgery* 113(2), 234–235.
- Cooper R, Jenkins L, Hooper S. (2014).** Inhibition of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by Medihoney *in vitro*. *Journal of Wound Care*, (23; 3), pp 93 – 104.
- Cooper R.A, Halas E, Molan P.C.(2002)** The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burn Care Rehabil.* 2002;23:366–370.
- Couquet Y.(2013).** Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités pharmaceutiques.* dossier n° 531 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actpha.2013.10.005>.
- Cramer J.A, Prestegard J.H (1977)** NMR studies of pH induces transport of carboxylic acids across phospholipid vesicle membranes. *Biophys Res Commun* 75, 295-301.
- Deschamps V.C. (1998).** *Production et commercialisation du miel.* Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, 118 p.

Donnio P.Y, Gaschet A, Cady A. (2010). Actualités du traitement antibiotique des infections à *Staphylococcus aureus*. *Médecine thérapeutique*. (16 :3) ; 244-51.

Duprat F, Gallant D, Guilbot A et al. (1980). L'amidon. In: *Les polymères végétaux*. Ed. B. Monties. Gauthier-Villars, Bordas Publ. pp176-231.

Edgar W.M, Jenkins G .N (1974) Solubility-reducing agents in honey and partly-refined crystalline sugar. *British Dental Journal* 136: 7-14.

Erdtman G. (1969) Handbook of palynology. An introduction to the study of pollen grains and spores. Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS(2011).. Oligosaccharides might contribute to the antidiabetic effect of honey: a review of the literature. *Molecules*. 13:248–266. doi: 10.3390/molecules17010248.

Escrèche I, Visquert M, Carot J.M et al. (2008): Effect of honey thermal conditions on hydroxymethylfurfural content prior to pasteurization. *Food Sci. Technol. Int.* 14, 29–35.

Estevinho L, Pereira A.P, Moreira L.et al. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology* . 46(12), 3774–3779.

Estevinho L.M, Feas X, Seijas J.A.et al. (2012). Organic honey from Tras-Os-Montes region (Portugal): chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 258–264.

EU (2001). Council Directive 2001/110 relating to honey. *Official Journal of the European Communities*.

EU (2002b). Application for registration of a certificate of specific character, Council Regulation No. 2082/92. *Official Journal of the European Communities*, 63, 23–24.

European Commission (2002) Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey, *Off. J. Eur. Communities* L10, 47–52.

Ferreira I.C.F.R, Aires E, Barreira J.C.M, et al. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 1438-1443.

Frankel S, Robinson G.E, Berenbaum M.R. (1998). Antioxidant capacity and correlation characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apiculture Research* 37, 27–31.

Freese E, Sheu CW, Galliers E (1973) Function of lipophilic acids as antimicrobial food additive. *Nature (Londres)*, 241, 321-325.

Gheldof N, Engeseth N.J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 3050–3055.

Gheldof N, Wang X, Engeseth N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5870–5877.

- Giske C.G, Sundsfjord A.S, Kahlmeter G et al.(2009).** Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. . *Antimicrob. Chemother.* 63 (1): 1-4. doi: 10.1093/jac/dkn444.
- Golob T, Dobers k U, Kump P, & Nec mer M. (2005)** Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry* 91:593-600.
- Gonnet M. (1982).** Le miel : composition, propriétés, conservation. INRA station expérimentale d'apiculture, 1982 : 1-18.
- Gout J. & Jardel C. (1998).** Le monde du miel et des abeilles, Delachaux et Niestl , 160p.
- Guiraud J. P. (2003):** Microbiologie alimentaire,  dition: Dunod, Paris. P: 9, 98 et 604.
- Gurtu S. (2012):** Honey supplementation in spontaneously hypertensive rats elicits antihypertensive effect via amelioration of renal oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2012:374037.
- Hadorn H.(1962)** " ber wärme und lagersch digungen von bienenhonig". *Trac. Chim. Alim. Hyg. (Berne).* 53 (3) , 191-192.
- Haffejee I. E. & Moosa A. (1985).** Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *B. M. J.* 290: 1966-1967.
- Halliwell B, & Gutteridge J. (1989).** *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford, UK: Calendon Press
- Halliwell B. (1990).**How to characterize a biological antioxidant? *Free Radical Research Commun. ;* 9(1):1-32.
- Halliwell B. (1991).** Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 91, 14–22.
- Hassanain A.T, Alyaa A.K, Karim A.J (2010).** Antimicrobial effect of Malaysian honey on some human pathogens: An in vitro study. *Intern. Med. J.,* 9(2): 15-18.
- Heim K.E, Tagliaferro A.R, Bobilya D.J. (2002)** Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13: 572-584.
- Helander I .K, Alakomi H. L, Latva-Kala K et al. (1998).** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem.* 1998;46:3590–3595.
- Hempel N, Ye H, Abessi B, et al. (2009).** Altered redox status accompanies progression to metastatic human bladder cancer. *Free Radical Biology and Medicine.* 46:42–50.
- Huang D, Ou B, Prior R.L (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Res* 53: 1841–1856.

Huang W.F, Jiang J.H, Chen Y.W.et al. (2005) Complete rRNA sequence of the *Nosema ceranae* from honeybee (*Apis mellifera*), <https://gra103.aca.ntu.edu.tw/gdoc/F90632004a.pdf>.

Huchet Julie C, Laurent G. (1996) : Les constituants chimiques du miel. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires. Cedex France : 01-09.

Hussein S.Z, Yusoff K.M, Makpol S.et al. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents increase with gamma irradiation in two types of Malaysian honey. *Molecules* 16(8): 6378-6395.

Huttunen et al. (2013). Antimicrobial activity of different Finnish monofloral honeys against human pathogenic bacteria. *APMIS*.121 (9): 827–834.

Hyslop PA, Hinshaw DB, Scraufstatter IU et al. (1995) Cochrane CG, Kunz S and Vosbeck K. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defence. *Free radical Biology and Medicin* 1995; 19(1): 31-7.

Ialomiteanu M .Y Daghie, V (1973). Investigaciones sobre los principios antibióticos du miel. XXIV Congreso Internacional de Apicultura. Apimondia. 438.440.

Ingram M, Ottoway FJH, Coppock JBM (1956) .The preservative action of acid substances in food. *Chem Ind (Lond)* 42, 1154-1163.

Israili Z.H.(2013). Antimicrobial Properties of Honey. *American Journal of Therapeutics*. 1075–2765.

James O.B.O’L, Segree W, Ventura A.K (1972). Some antibacterial properties of Jamaican honey. *WI Med J* 12, 7-17.

Jeffrey A.E, Echazarreta C.M. (1996). Medical uses of honey. *Rev. Biomed.*, 7: 43 – 49.

Kajiwara S, Gandhi H, Ustunol Z. (2002) Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium* spp.: An in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *J. Food Prot.* 65, 214-218.

Kāskoniene V, Venskutonis PR, Č eksteryte V. (2010). Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT Food Sci Technol* 43:801–7.

Kassim M, Achoui M, Mansor M, et al. (2010) The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E(2) in inflammatory tissues. *Fitoterapia* , 81, 1196–1201.

Keast-Butler, J. (1980) Honey for necrotic malignant breast ulcers. *Lancet* ii (October 11), 809.

Ketsawatsakul U, Whiteman M, Hallowell B (2000) A reevaluation of the peroxy-nitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279: 692–9.

Khalil I, Moniruzzaman M, Boukraa L et al. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, 17: 11199-11215.

Khenfer A, Fettal M. (2001)., Le Miel, édition ELAFAK. PP 5-22.

- Khiati B, Bacha S, Ahmed M , et al. (2013).**Wound Care with Euphorbia Honey after Nucleation: A Case Report. Clin Microbial, 2:6
- Koc A.N, Silici S, Kasap F, et al. (2011).** Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. J. Med. Food, 14, 128-134.
- Krpan M, Marković K, Šarić G et al. (2009)** Antioxidant activities and total phenolics of acacia honey. Czech J Food Sci 27: S245-S247.
- Küçük M, Kolaylı S, Karaoğlu Ş,et al. (2007)** Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types from Anatolia. Food Chem. 100, 526-534.
- Kwakman P, te Velde A, de Boer L, et al. (2010)** How honey kills bacteria. FASEB J ,24:2576e2582.
- Kwakman P.H.S, de Boer L, Ruyter-Spira CP, et al. (2011)** Medical- grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 30:251–257.
- Lachman J, Orsák M, Hejtmánková, A et al. (2010).** Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. LWT – Food Science and Technology, 43, 52–58.
- Louveaux J, Abed L. (1984)** Les miels d’Afrique du nord et leur spectre pollinique, Apidologie 15, 145–170.
- Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G. (1978)** Methods of Melissopalynology, Bee World 59, 139–157.
- Louveaux J. (1980).** Les abeilles et leur élevage. Edition: Hachette. PP 1.
- Louveaux J. (1985).** Les produits du rucher. In « Les abeilles et leur élevage »: 165 -199.
- Lusby P.E, Coombes A, Wilkinson J.M. (2002)** Honey: a potent agent for wound healing? J Wound Ostomy Con-tinence Nurs, 29(6), 295-300.
- Maataoui B.S, Hmyene A, Hilati S. (2006):** Activités anti-radicalaires d’extraits de jus de fruits du figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus Indica*). Libanese Science Journal. 7(1), 3-7.
- Machiels D, Istasse L. (2002):** La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments. Ann. Méd. Vét. 146, 347-352.
- Macris B.J (1975)** Mechanisms of benzoic acid uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol 30, 503-506.
- Makhloufi C, Kerkvliet D, Ricciardelli D’albore G et al. (2010).** Characterization of Algerian honeys by palynological and physico- chemical methods. Apidologie 41:509-521.
- Makhloufi C, Schweizer P, Azouzi C et al. (2007)** Some properties of Algerian honey, Apiacta 42, 73–80.
- Marchenay P, Berard L. (2007).** L’homme, l’abeille et le miel. Editions De Borée, Romagnant, 224 p.
- Marcucci M.C. (1995).** Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. In Apidologie, 1995, no. 26, p. 83-99.

Massaux C, Bodson B, Lenartz J et al. (2006) L'amidon natif du grain de blé : un composé naturel à valoriser par la connaissance de ses propriétés techno-fonctionnelles, Livre blanc « céréales » F.U.S.A. et CRA-W Gembloux, pp. 3 et 5

Mato I, Huidobro J. F Sánchez M. P. et al. (1997). Enzymatic determination of total D-gluconic acid in honey. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3550–3553.

Mbogning E. (2005). Etude des plantes médicinales et caractérisation du pollen des plantes mellifères et du miel du Cameroun. Thèse de Master en Transfert des technologies en Biomédecine, Université de Rome «Tor Vergata», 64 p.

Meda A, Lamien C. E, Millogo J. et al. (2005): Physicochemical Analyses of Burkina Faso Honey, édition: Acta Vet. Brno. Ouaga 01, revue n°: 74, Burkina Faso. PP: 147-152.

Meda A, Lamien C.E, Romito M et al. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* 91, 571–577.

Mensor LI, Menezes FS, Leitao GG, (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* 15, 127-130.

Mescle J. F. & Zucca J. (1996): Les facteurs de développement, in: *Microbiologie alimentaire*; Tome1 (Bourgeois. C. M, Mescle. J. F et Zucca. J, editors) édition: Lavoisier, Technique et Documentation, Londres Paris New York. Chapitre 1.PP: 4-33.

Miraglio A. M, Beuchat L. R, Coulston A. M. et al.(2003): Honey–Health and Therapeutic Qualities. Provided by the National Honey Board. PP: 1-28.

Molan P. C. (1995) “The antibacterial properties of honey.” *Chemistry in New Zealand* 59(4):10-14.

Molan P.C. (2001a). Why honey is effective as a medicine, *Honey healing*, éditions P. Munn and R. Jones, International bee research Association, Cardiff, UK.

Molan P.C. (2002) «Honey provides an effective and harmless source of hydrogen peroxide for chemokine and antibacterial roles in wound care.” - a paper presented at the 4th Australian Wound Management Association Conference, Adelaide, Australia.

Molan P.C.(1992). The antibacterial activity of honey. *Bee World*, 1992, 73, 5-28.

Morales F.J. (2009) Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In : Stadler R.H., Lineback D.R. (Eds), *Process-Induced Food Toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks*. Wiley-Blackwell : Hoboken. 135.

Muhrbeck P, Teiller C (1991) Determination of the phosphorylation of starch from native potato varieties by ³¹P NMR. *Stärke* 43.

Nagai T, Inoue R, Inoue H et al. (2002). Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals and DPPH radicals. *Nut Res*; 22 : 519-26.

Nagai T, Inoue R, Kanamori N, et al. (2006) Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chem.*, 97: 256-262.

Odds F. C. (1988) *Candida and Candidosis: A Review and Bibliography*, 2nd ed., Balliere Tindall, London.

ONERBA (2006) Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (2006).

Organisation mondiale de la santé (OMS) (2002) Rapport sur la santé dans le monde. Réduire les risques et promouvoir une vie saine. Ed Genève, 48 p.

Oršolić N, Knežević A, Šver L, et al. (2003) Influence of honey bee products on transplantable murine tumors. *Veterinary and Comparative Oncology* 1 (4): 216-226.

Ouchemoukh S, Louaileche H, Schweitzer P. (2007): Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control*. 18, 52–58.

Oyaizu M. (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nut.* 44, 307–315.

Palasinski M (1980) Uber die phosphorseure der kartoffelstiirke. *Staerke* 32 405-408.

Persano Oddo L, Piazza M. G. & Pulcini P. (1999) Invertase activity in honey. *Apidologie*, 30: 57-65.

Persano Oddo L, Piazza M.G, Sabatini A.G et al. (1995). Characterization of unifloral honeys. *Apidologie* 26 (1995): 453 – 465.

Persano Oddo L, Piro R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets, *Apidologie* 35 (Suppl. 1), S38–S81.

Philippe J. M. (1999): *Le guide de l'apiculteur*, 3ème édition: Sarl Edisud, la calade, France.347p.

Piazza MG, Accorti M, Persano Oddo L (1991). Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura*; 7 : 51-63.

Pimentel et al. (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:151.

Podschun R, Ullmann U.(1998) *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin. Microbiol. Rev.* (11: 4); 589-603.

Powers S.K, & Hamilton K. (1999). Antioxidants and exercise. *Clinics in Sports Medicine*, 18, 525-536.

Priga M. (1938). Uber die baktericide wirkung des naturhonig. *Z Hyg Infekt Krankh* 120:437-43.

Přidal A, Vorlová L. (2002). Honey and its physical parameters. *Czech J. Anim. Sci.*, 47, (10): 439–444.

Puntarulo S. (2005). Iron, oxidative stress and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 299–312.

Radak Z, Chung H.Y, Goto S. (2008a). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology Medicine*. 44:153- 159.

Radak Z, Chung H.Y, Koltai E, et al. (2008b). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews*. 7:34–42.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A. et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231–1237.

Ricardo da Silva J. M, Darmon N, Fernandez Y. et al. (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1549–1552.

Ricciardelli d'Albore G. (1998) Mediterranean melissopalynology, Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi, Perugia.

Salah N, Miller N. J, Paganga G et al. (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(2), 339–346.

Sánchez-Moreno C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 8: 121-137.

Saxena S, Gautam S, Sharma A (2010) Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem* 118: 391-397.

Sela M.O, Shapira L, Grizim I, et al. (1998). Effects of honey consumption on enamel microhardness in normal versus xerostomic patients, *Oral. Rehab.* 25, 630–634.

Sharma O.P, Bhat T.K (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 113: 1201–1205.

Siegenthaler U (1977) Eine einfache und rasche Methode zur Bestimmung der α -Glucosidase(Sacharase) in Honig. *Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg* 68, 251-258.

Silva D.J, Queiroz A.C. (2002): Determinação do nitrogênio total e da proteína bruta. (Eds.) *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, p.57-75.

Singleton V.L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152–178.

Somerfield S.D. (1991) Honey and healing. *Journal of Royal Society of Medicine* 84(3), 179.

Srisayam M, Chantawannakul P (2010) Antimicrobial and antioxidant properties of honeys produced by *Apis Mellifera* in Thailand. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science* 2 (2): 77-83. DOI: 10.3896/IBRA.4.02.2.03.

- Stone H. H. & Martin J. D. (1969)** Pulmonary injury associated with thermal burns. *Surg. Gynecol. Obstet.* 129, 1242.
- Taormina P.J, Niemira B.A, Beuchat L.R.(2001).** Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 217–225.
- Tara A. (2005).** Modification chimique de l'amidon par extrusion réactive. Thèse de doctorat. 436 pages.
- Terrab A, Vega-Pérez J.M, Diez M.J. et al. (2001).** Characterisation of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic- mass spectrometric analysis of their sugar components. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 179–185.
- Theunissen F, Grobler S, Gedalia I (2001)** The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. *Apidologie.* 32:371–379.
- Tysset C. Und Rousseau M.(1981):** Le problème du microbisme et de l'hygiène des miels du commerce, *Rev. Med. vet.*132, 591-600.
- Ultee A, Kets E. P. W. & Smid J. (1999).** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 65, 4606–4610.
- Van ketel B.A. (1892).** Feestnummer der Berichsten van de Nederlandse Maatschappij ter Bevordering der Pharmacie 67/96.
- Vannier P. (1998).**Au pays du miel, Flammarion, 159p.
- Vannier P. (1999).** Miel ; édition Flammarion. 119p.
- Vela L, De Lorenzo C, Pérez R. A. (2007) -** Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *J. Sci. Food Agric.*, 87: 1069-1075.
- Vercauteren R, Rapaille A.(1999).** Sources, modes de production et propriétés technologiques. In: Dossier scientifique de l'IFN n°11 «Les glucides» tome 1.
- Vlayen P. (1995).**Miel et Botulisme. *Les Carnets du CARI*, 46, 14-16.
- Vorlová L. & Elechovská O. (2002).** Activity of enzymes and trace element content in bee honey. *Acta Vet. Brno.* 71, 375–378.
- Vorwohl G. (1964) -** Die Beziehungen zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtsmassigen Herkunft. - *Ann. Abeille* 7(4) : 301 - 309.
- Wactawski-Wende J, Schisterman E.F, Hovey K.M,et al. (2009).** BioCycle Study Group. BioCycle study: design of the longitudinal study of the oxidative stress and hormone variation during the menstrual cycle. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 23(2):171-84.
- Wahdan H.A. (1998).** Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*, 1998 Jan-Feb, 26(1), 26-31.

Watanabe K, Shinmoto H, Kobori M, et al. (1996) Growth stimulation with honey royal jelly DIII protein of human lymphocytic cell lines in a serum-free medium., *Biotechnol. Tech.* 10, 959-962.

Weiss K, (1985). L'apiculture de week-end édition européennes apicoles Bruxelles. 252p.

Wellford T.E, Eadie T. & Liewellyn G.C. (1978): Evaluation the inhibitory action of honey on fungal growth sporulation. In aflatoxin production. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 28: 280-283.

Wen-Chien Ko, Paterson D.L, Anthanasia Jet al. (2002). Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. *Emerging Infectious Diseases.* (8 :2). 160- 166.

Weston R.J, Brocklebank L.K, Lu Y.(2000) Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chemistry.*70:427-35.

White J. (1962): cite par lauveaux J: composition, propriétés et technologie du miel in traité de la biologie de l'abeille .Tome 3 les produits de la ruche.

White J. (1979), Spectrophotometric method for hydroxymethyl furfural in honey, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62, pages 509–514.

White J.(1981): Natural honey toxicants. *Bee world* 62, 23-28.

White J.W, Subers M.H.(1964a) Studies on honey Inhibine: 4. Destruction of the peroxide accumulation system by light.*J Food Sci ;*29:819–8.

White J.W, Subers MH (1963) Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay. *J Apic Res* 2, 93-100.

White J.W.(1978) Honey. *Adv Food Res* 24: 287–375.

Yilmaz H,& Küfreviöglu I. (2001): Composition of honeys collected from Eastern and south-Eastern Anatolia and effect of storage on Hydroxymethylfurfural, content and diastase Activity, revue n°: 25, édition: Tübitak. Turk. Agric. PP: 347-349.

Zeina B, Othman O, al-Assad S.(1996). Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro. *J Altern Complement Med.* 1996;2:345–348.

Zeina B, Zohra BI, Assad S. (1997). The effects of honey on Leishmania parasites: an in vitro study. *Trop Doct.* 1997;/ 27(Suppl 1):36–38.

Absar N, Zaidul I.S.M, Takigawa S, et al. (2009). Enzymatic hydrolysis of potato starches containing different amounts of phosphorus. *Food Chem.* 112:57–62.

Afonso V, Champy R, Mitrovic D, et al. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine.* 74: 324-329.

Afonso A.S, Medeiros AS, Nunes C.S.et al. (2007). Florística da vegetação arbustiva aberta na Restinga da Marambaia, RJ. *Revista Brasileira de Biociências* vol. 5, p. 450-452.

Al Waili N.S. (2004a). Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions. *Medical Science Monitor*, 2004 b, 10 (8), 94-98.

Alandejani T, Marsan J, Ferris W, et al. (2009) Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *Otolaryngol Head Neck Surg.* 141(1):114-8.

Alexander in Makhloufi, (2003) L'apiculture d'aujourd'hui. 2^{ème} édition dargaud éditeur. PP 91-125.

Ali A. T. M. M. (1997) Natural honey prevents ischaemia-reperfusion-induced gastric mucosal lesions and increased vascular permeability in rats. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9 (11): 1101-1107.

Aljadi A.M & Kamaruddin M.Y. (2004). Evaluation of the phenolic and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 513–518.

Allen K.L, Molan P.C, Reid G.M. (1991). A survey of the antimicrobial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43, 817–822.

Al-Mamary M, Al-Meerri A Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of Yemeni honey. *Nutrition Research*, 22, 1041–1047.

Alvarez-Suárez J. M, Tulipani S, Romandini SET al. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health, a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3(1), 15–23.

AL-Waili N, Ghamdi A. A, Ansari M. J et al. (2013). Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of Medical Research.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.04.009>.

Al-Waili N.(2004). Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J Med Food* 2004;7:210e222.

Al-Waili N.S, Akmal M, Al-Waili FS, et al. (2005). The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. *Med Sci Monit.*;11:433– 438.

Al-Waili N.S, Saloom K.S, Al-Waili T.N, et al. (2006). The safety and efficacy of a mixture of honey, olive oil, and beeswax for the management of hemorrhoids and anal fissure: a pilot study. *Sci World J.* 6:1998–2005.

Al-Waili NS.(2005). Effects of honey on the urinary total nitrite and prostaglandins concentration. *Int Urol Nephrol* 2005;37:107e111.

Alzahrani HA, Alsabehi R, Boukraâ L,et al. (2012). Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules*, 17: 10540-10549.

Amaral S, Mira L, Nogueira JM, et al. M. (2009). Plant extracts with anti-inflammatory properties--a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorg Med Chem.* 17(5):1876–1883.

Amorowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, et al. (2004) Free radical scavenging capacity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* 84: 551–62.

Angelov T, Guainazzi A, Scharer OD. (2009). Generation of DNA interstrand cross-links by post-synthetic reductive amination. *Org Lett.* 2009;11:661–664.

Antolovic M, Prenzler P.D, Patsalides E.et al. (2002). K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002, 127, 183–198.

AOAC (1984) Official methods of analysis. 14th ed. Washington DC, Association of Official Analytical Chemists.

Audigie C. (1980): Biochimie structurale, édition: Doin, Paris. PP: 101-103.

Augustyniak A, Bartosz G, Cipak A, et al. 2010. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radic Res*, 44, 1216-1262.

Bacha H. C. (2003): Le miel entre le coran et la science, revue: Al-iajaz Alilmi n°: 15. PP: 6-11.

Baltrusaityte V, Venskutonis PR, Ceksteryte V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem.* 101:502–514.

Bang L. M, Bunting C, & Molan P. C. (2003). The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implication for wound healing. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9, 267–273.

Belostotskiĭ N.I, Kas'ianenko V.I, Dubtsova E.A,et al. (2009). Influence of honey, royal jelly and propolis on accelerating acetate healing of experimental gastric ulcers in rats *Eksp Klin Gastroenterol.* (6):46-50.

Benzie I.F.F, Strain J.J (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76.

Berche P, Gaillard J.L & Simonet M. (1999). Bactériologie : bactéries des infections humaines. Edition Flammarion Médecine-Sciences, collection de la biologie à la clinique, Paris, 1988, tirage 1991, pp. 230-238.

Beretta G, Granata P, Ferrero M.et al. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/ fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 185-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>

Bertoncelj J, Dobersék U, Jamnik M, et al. (2007). Evaluation of the phenolic content antioxidant activity and color of Slovenian honey. *Food Chemistry* 105, 822–828.

Biri M, (1999). Le grand livre des abeilles. L'apiculture moderne. Edition vecchi S. A paris. 260 p.

Biswal B.M, Zakaria A, Ahmad N.M. (2003) Topical application of honey in the management of radiation mucositis: a preliminary study. *Supportive Care in Cancer* 11: 242–248.

- Blair S.E, Cokcetin N.N, Harry E.J, Carter D.A. (2009)** The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptom analysis *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 28(10):1199-1208.
- Bocquet M. (1997)**, Le miel d'Eucalyptus. Nature et composition, principales caractéristiques organoleptiques. *Bull Tech Apic* 24 : 151-2.
- Bogdanov S (2002)** Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products: pp 1-7.
- Bogdanov S (2009)** Honey technology. *Bee Product Science* online at www.beehexagon.net (3): 1-5.
- Bogdanov S, Bieri K, Figar M et al. (1995)** Kapitel 23 Bienenprodukte: 23A Honig. *Schweiz.Lebensmittelbuch* (11).
- Bogdanov S, Bieri K, Gremaud G.et al. (2004a)**. *Swiss Food Manual: Pollen Bienenprodukte*, BAG (Swiss Federal Office for Public Health); Berne.
- Bogdanov S, Gallmann P, Stangaciu S et al. (2006)** Bienenprodukte und Gesundheit. *AlpForum* 41: 3-50.
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber et al. (2008)** Honey for Nutrition and Health: A Review. *J.Am..Coll.Nutr.* 27: 677-689.
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R et al. (2006)**. Honey for nutrition and health: A review. *Am. J. Coll. Nutr.*, 27: 677-689.
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R et al. (2008)** Honey for Nutrition and Health: A Review. *J.Am. Coll.Nutr.* 27: 677-689.
- Bogdanov S, Lüllman C, Martin P et al.(1997)**. Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission. *Bee World*, 80 (2) : 61–69.
- Bogdanov S, Martin P, Lüllmann C. (1997)** – Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie* (extra issue): 1-59.
- Bogdanov S, Matzke A (2003)** Honig - eine natürliche Süsse, In Matzke, A; Bogdanov, S (eds) *Der Schweizerische Bienenvater, Bienenprodukte und Apitherapie*, Fachschriftenverlag VDRB; Winikon, Switzerland; pp 7-40.
- Bogdanov S, Ruoff K. & Persano Oddo L. (2004 b)**. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, 35: S4–S17.
- Bogdanov S. & Blumer P. (2001)**. Propriétés antibiotiques naturelles du miel. *Revue Suisse d'Apiculture*, 98 (3) : 107-114.
- Bogdanov S. (1997)**. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel Wissencharnd und Technology*, 30, 748–753.
- Bogdanov S. (1999)**. Stockage, Cristallisation et liquéfaction du miel. *Centre Suisse de Recherche Apicole* : 1-5.

Bogdanov S. (2009). Harmonised methods of the International Honey Commission, responsible for the methods: pp. 1–54.

Bogdanov S. Bieri K. Gremaud G et al. (2004). Swiss Food Manual: Gelée Royale Bienenprodukte, BAG (Swiss Federal Office for Public Health); Berne: 23-26.

Bogdanov, S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel Wissencharnd und Technology*, 30, 748–753.

Bonte F, Desmouliere A.(2013). Honey: origin and composition. *pharmaceutiques* 52 . 531 , p. 18-21.

Bowen W. H, & Lawrence R. A. (2005). Comparison of the cariogenicity of Cola, honey, cow milk, human milk, and sucrose. *Pediatrics*, 116, 921-926.

Braide W, Oranusi S.U, Akaluka C.K et al.(2012). Antibacterial efficacy of crude and diluted honey on four wound isolates. *global advanced research journal of microbiology*. 1(1), pp 001-004.

Braniki F. J. (1981) Surgery in Western Kenya. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 63: 348-352.

Bremer E. (2014).Liberate and grab it, ingest and digest it: the GbdR regulon of the pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 196:1 7-15. doi:10.1128/JB.01055-13.

Brudzynski K, & Lannigan, R. (2012). Mechansim of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. *Front. Microbiol.* 3:36.

Brudzynski K, & Miotto D. (2010a). The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chemistry*, 124, 869–874.

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

Brudzynski K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Can. J. Microbiol.* 52, 1228–1237.10.1139/w06-086.

Burda S, Oleszek W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.* 49(6):2774-9.

CA SFM (2010). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Cabroliera N, Lafoliea J, Bertrand X. (2014). Epidemiology and risk factors of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal des Anti-infectieux*. 16:1; 8–12.

Caillas A. (1947).Les produits de la ruche: le miel, la cire, le pollen, 3^o Edition, Chez l'auteur, Bois d'Arcy.

Caillas A. (1974). La propolis, in L'Abeille de France et l'Apiculteur, Mars, 1974. P : 97-98.

Carpentier J.P. (20013). Infections à bacille pyocyanique. *Maladies infectieuses* p24.

Castaldo S, Capasso F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. In *Fitoterapia.*, vol. 73, 2002, Suppl. 1, p. 1-6.

Cavallo J.D, Leblanc F, Fabre R et al. (1999). Survey of the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in France and the distribution of b-lactam resistance mechanisms: the GERPB study. *Pathol Biol* 2001; 49: 534–9.

Cervantes M. A. R, Novelo-gonzalez S. A & Duch-sauri E, (2000). Effect of the temporary thermic treatment of honey on variation of the quality of the same during storage. *Apiacta*, 35:162-170.

Chakir A, Romane A, Marcazzan GL et al.(2011). Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry* (2011), doi:10.1016/j.arabjc.2011.10.013.

Chauvin R. (1968). *Traité de la biologie de l'abeille*, Masson et Cie, éditeurs, Paris. PP : 66-81 et 277-319.

Chen HY, Lin YC, Hsieh CL (2007) Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chem* 104: 1418-1424.

Clément M.C. (2002). *Melissopalynologie en Nouvelle-Calédonie, importance des spectres polliniques dans la typification des miels*. Mém. E.P.H.E., 77 p.

Codex Alimentarius Commission: (1993). Revised Codex Standards for Sugars and Honey; CX 5/10.2; CL (1993)/14-SH; Via delle Terme di Caracalla, Rome

Condon R.E. (1993) Curious interaction of bugs and bees. *Surgery* 113(2), 234–235.

Cooper R, Jenkins L, Hooper S. (2014). Inhibition of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by Medihoney *in vitro*. *Journal of Wound Care*, (23; 3), pp 93 – 104.

Cooper R.A, Halas E, Molan P.C.(2002) The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burn Care Rehabil.* 2002;23:366–370.

Couquet Y.(2013). Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités pharmaceutiques*. dossier n° 531 <http://dx.doi.org/10.1016/j.actpha.2013.10.005>.

Cramer J.A, Prestegard J.H (1977) NMR studies of pH induces transport of carboxylic acids across phospholipid vesicle membranes. *Biophys Res Commun* 75, 295-301.

Deschamps V.C. (1998). *Production et commercialisation du miel*. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, 118 p.

Donnio P.Y, Gaschet A, Cady A. (2010). Actualités du traitement antibiotique des infections à *Staphylococcus aureus*. *Médecine thérapeutique*. (16 :3) ; 244-51.

Duprat F, Gallant D, Guilbot A et al. (1980). L'amidon. In: *Les polymères végétaux*. Ed. B. Monties. Gauthier-Villars, Bordas Publ. pp176-231.

Edgar W.M, Jenkins G .N (1974) Solubility-reducing agents in honey and partly-refined crystalline sugar. *British Dental Journal* 136: 7-14.

Erdtman G. (1969) Handbook of palynology. An introduction to the study of pollen grains and spores. Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS(2011).. Oligosaccharides might contribute to the antidiabetic effect of honey: a review of the literature. *Molecules*. 13:248–266. doi: 10.3390/molecules17010248.

Escriche I, Visquert M, Carot J.M et al. (2008): Effect of honey thermal conditions on hydroxymethylfurfural content prior to pasteurization. *Food Sci. Technol. Int.* 14, 29–35.

Estevinho L, Pereira A.P, Moreira L.et al. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology* . 46(12), 3774–3779.

Estevinho L.M, Feas X, Seijas J.A.et al. (2012). Organic honey from Tras-Os-Montes region (Portugal): chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 258–264.

EU (2001). Council Directive 2001/110 relating to honey. *Official Journal of the European Communities*.

EU (2002b). Application for registration of a certificate of specific character, Council Regulation No. 2082/92. *Official Journal of the European Communities*, 63, 23–24.

European Commission (2002) Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey, *Off. J. Eur. Communities L10*, 47–52.

Ferreira I.C.F.R, Aires E, Barreira J.C.M, et al. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 1438-1443.

Frankel S, Robinson G.E, Berenbaum M.R. (1998). Antioxidant capacity and correlation characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apiculture Research* 37, 27–31.

Freese E, Sheu CW, Galliers E (1973) Function of lipophilic acids as antimicrobial food additive. *Nature (Londres)*, 241, 321-325.

Gheldof N, Engeseth N.J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 3050–3055.

Gheldof N, Wang X, Engeseth N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5870–5877.

Giske C.G, Sundsfjord A.S, Kahlmeter G et al.(2009). Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. . *Antimicrob. Chemother.* 63 (1): 1-4. doi: 10.1093/jac/dkn444.

Golob T, Dobersěk U, Kump P, & Necemer M. (2005) Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry* 91:593-600.

Gonnet M. (1982). Le miel : composition, propriétés, conservation. INRA station expérimentale d'apiculture, 1982 : 1-18.

Gout J. & Jardel C. (1998). Le monde du miel et des abeilles, Delachaux et Niestlé, 160p.

Guiraud J. P. (2003): Microbiologie alimentaire, édition: Dunod, Paris. P: 9, 98 et 604.

Gurtu S. (2012): Honey supplementation in spontaneously hypertensive rats elicits antihypertensive effect via amelioration of renal oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2012:374037.

Hadorn H.(1962) "über wärme und lagerschädigungen von bienenhonig". *Trac. Chim. Alim. Hyg. (Berne).* 53 (3) , 191-192.

Haffejee I. E. & Moosa A. (1985). Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *B. M. J.* 290: 1966-1967.

Halliwell B, & Gutteridge J. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford, UK: Calendon Press

Halliwell B. (1990).How to characterize a biological antioxidant? *Free Radical Research Commun.* ; 9(1):1-32.

Halliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 91, 14–22.

Hassanain A.T, Alyaa A.K, Karim A.J (2010). Antimicrobial effect of Malaysian honey on some human pathogens: An in vitro study. *Intern. Med. J.,* 9(2): 15-18.

Heim K.E, Tagliaferro A.R, Bobilya D.J. (2002) Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13: 572-584.

Helander I.K, Alakomi H. L, Latva-Kala K et al. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem.* 1998;46:3590–3595.

Hempel N, Ye H, Abessi B, et al. (2009). Altered redox status accompanies progression to metastatic human bladder cancer. *Free Radical Biology and Medicine.* 46:42–50.

Huang D, Ou B, Prior R.L (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Res* 53: 1841–1856.

Huang W.F, Jiang J.H, Chen Y.W.et al. (2005) Complete rRNA sequence of the *Nosema ceranae* from honeybee (*Apis mellifera*), <https://gra103.aca.ntu.edu.tw/gdoc/F90632004a.pdf>.

Huchet Julie C, Laurent G. (1996) : Les constituants chimiques du miel. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires. Cedex France : 01-09.

Hussein S.Z, Yusoff K.M, Makpol S.et al. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents increase with gamma irradiation in two types of Malaysian honey. *Molecules* 16(8): 6378-6395.

Huttunen et al. (2013). Antimicrobial activity of different Finnish monofloral honeys against human pathogenic bacteria. *APMIS*.121 (9): 827–834.

Hyslop PA, Hinshaw DB, Scraufstatter IU et al. (1995) Cochrane CG, Kunz S and Vosbeck K. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defence. *Free radical Biology and Medicin* 1995; 19(1): 31-7.

Ialomiteanu M .Y Daghie, V (1973). Investigaciones sobre los principios antibióticos du miel. XXIV Congreso Internacional de Apicultura. Apimondia. 438.440.

Ingram M, Ottoway FJH, Coppock JBM (1956) .The preservative action of acid substances in food. *Chem Ind (Lond)* 42, 1154-1163.

Israili Z.H.(2013). Antimicrobial Properties of Honey. *American Journal of Therapeutics*. 1075–2765.

James O.B.O’L, Segree W, Ventura A.K (1972). Some antibacterial properties of Jamaican honey. *WI Med J* 12, 7-17.

Jeffrey A.E, Echazarreta C.M. (1996). Medical uses of honey. *Rev. Biomed.*, 7: 43 – 49.

Kajiwara S, Gandhi H, Ustunol Z. (2002) Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium* spp.: An in vitro comparison with commercial oligosaccharides and inulin. *J. Food Prot.* 65, 214-218.

Kāskoniene V, Venskutonis PR, Č eksteryte V. (2010). Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT Food Sci Technol* 43:801–7.

Kassim M, Achoui M, Mansor M, et al. (2010) The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E(2) in inflammatory tissues. *Fitoterapia* , 81, 1196–1201.

Keast-Butler, J. (1980) Honey for necrotic malignant breast ulcers. *Lancet* ii (October 11), 809.

Ketsawatsakul U, Whiteman M, Hallowell B (2000) A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279: 692–9.

Khalil I, Moniruzzaman M, Boukraa L et al. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, 17: 11199-11215.

Khenfer A, Fettal M. (2001)., *Le Miel*, édition ELAFAK. PP 5-22.

Khiati B, Bacha S, Ahmed M , et al. (2013).Wound Care with Euphorbia Honey after Nucleation: A Case Report. *Clin Microbial*, 2:6

Koc A.N, Silici S, Kasap F, et al. (2011). Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. *J. Med. Food*, 14, 128-134.

Krpan M, Marković K, Šarić G et al. (2009) Antioxidant activities and total phenolics af acacia honey. *Czech J Food Sci* 27: S245-S247.

Küçük M, Kolayli S, Karaoğlu Ş, et al. (2007) Biological Activities and Chemical Composition of Three Honeys of Different Types from Anatolia. *Food Chem.* 100, 526-534.

Kwakman P, te Velde A, de Boer L, et al. (2010) How honey kills bacteria. *FASEB J* ,24:2576e2582.

Kwakman P.H.S, de Boer L, Ruyter-Spira CP, et al. (2011) Medical- grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30:251–257.

Lachman J, Orsák M, Hejtmánková, A et al. (2010). Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 52–58.

Louveaux J, Abed L. (1984) Les miels d’Afrique du nord et leur spectre pollinique, *Apidologie* 15, 145–170.

Louveaux J, Maurizio A, Vorwohl G. (1978) Methods of Melissopalynology, *Bee World* 59, 139–157.

Louveaux J. (1980). Les abeilles et leur élevage. Edition: Hachette. PP 1.

Louveaux J. (1985). Les produits du rucher. In « Les abeilles et leur élevage »: 165 -199.

Lusby P.E, Coombes A, Wilkinson J.M. (2002) Honey: a potent agent for wound healing? *J Wound Ostomy Con-tinence Nurs*, 29(6), 295-300.

Maataoui B.S, Hmyene A, Hilati S. (2006): Activités anti-radicalaires d’extraits de jus de fruits du figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus Indica*). *Libanese Science Journal.* 7(1), 3-7.

Machiels D, Istasse L. (2002): La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments. *Ann. Méd. Vét.* 146, 347-352.

Macris B.J (1975) Mechanisms of benzoic acid uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol* 30, 503-506.

Makhloufi C, Kerkvliet D, Ricciardelli D’albore G et al. (2010). Characterization of Algerian honeys by palynological and physico- chemical methods. *Apidologie* 41:509-521.

Makhloufi C, Schweizer P, Azouzi C et al. (2007) Some properties of Algerian honey, *Apiacta* 42, 73–80.

Marchenay P, Berard L. (2007). L’homme, l’abeille et le miel. Editions De Borée, Romagnant, 224 p.

Marcucci M.C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. In *Apidologie*, 1995, no. 26, p. 83-99.

Massaux C, Bodson B, Lenartz J et al. (2006) L’amidon natif du grain de blé : un composé naturel à valoriser par la connaissance de ses propriétés techno-fonctionnelles, Livre blanc « céréales » F.U.S.A. et CRA-W Gembloux, pp. 3 et 5

Mato I, Huidobro J. F Sánchez M. P. et al. (1997). Enzymatic determination of total D-gluconic acid in honey. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3550–3553.

Mbogning E. (2005). Etude des plantes médicinales et caractérisation du pollen des plantes mellifères et du miel du Cameroun. Thèse de Master en Transfert des technologies en Biomédecine, Université de Rome «Tor Vergata», 64 p.

Meda A, Lamien C. E, Millogo J.et al. (2005): Physicochemical Analyses of Burkina Fasan Honey, édition: Acta Vet. Brno. Ouaga 01, revue n°: 74, Burkina Faso. PP: 147-152.

Meda A, Lamien C.E, Romito M et al. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry 91, 571–577.

Mensor LI, Menezes FS, Leitao GG, (2001). Screening of Brazillian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytother. Res. 15, 127-130.

Mescle J. F. & Zucca J. (1996): Les facteurs de développement, in: Microbiologie alimentaire; Tome1 (Bourgois. C. M, Mescle. J. F et Zucca. J, editors) édition: Lavoisier, Technique et Documentation, Londres Paris New York. Chapitre 1.PP: 4-33.

Miraglio A. M, Beuchat L. R, Coulston A. M.et al.(2003): Honey–Health and Therapeutic Qualities. Provided by the National Honey Board. PP: 1-28.

Molan P. C. (1995) “The antibacterial properties of honey.” Chemistry in New Zealand 59(4):10-14.

Molan P.C. (2001a). Why honey is effective as a medicine, Honey healing, éditions P. Munn and R. Jones, International bee research Association, Cardiff, UK.

Molan P.C. (2002) «Honey provides an effective and harmless source of hydrogen peroxide for chemokine and antibacterial roles in wound care." - a paper presented at the 4th Australian Wound Management Association Conference, Adelaide, Australia.

Molan P.C.(1992). The antibacterial activity of honey. Bee World, 1992, 73, 5-28.

Morales F.J. (2009) Hydroxymethylfurfural (HMF) and related compounds. In : Stadler R.H., Lineback D.R. (Eds), Process-Induced Food Toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks. Wiley-Blackwell : Hoboken. 135.

Muhrbeck P, Teiller C (1991) Determination of the phosphorylation of starch from native potato varieties by ³¹P NMR. Staerke 43.

Nagai T, Inoue R, Inoue H et al. (2002). Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals and DPPH radicals. Nut Res; 22 : 519-26.

Nagai T, Inoue R, Kanamori N, et al. (2006) Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. Food Chem., 97: 256-262.

Odds F. C. (1988) Candida and Candidosis: A Review and Bibliography, 2nd ed., Balliere Tindall, London.

ONERBA (2006) Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques (2006).

Organisation mondiale de la santé (OMS) (2002) Rapport sur la santé dans le monde. Réduire les risques et promouvoir une vie saine. Ed Genève, 48 p.

Oršolić N, Knežević A, Šver L, et al. (2003) Influence of honey bee products on transplantable murine tumors. *Veterinary and Comparative Oncology* 1 (4): 216-226.

Ouchemoukh S, Louaileche H, Schweitzer P. (2007): Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control*. 18, 52–58.

Oyaizu M. (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nut.* 44, 307–315.

Palasinski M (1980) Uber die phosphorseure der kartoffelstiirke. *Staerke* 32 405-408.

Persano Oddo L, Piazza M. G. & Pulcini P. (1999) Invertase activity in honey. *Apidologie*, 30: 57-65.

Persano Oddo L, Piazza M.G, Sabatini A.G et al. (1995). Characterization of unifloral honeys. *Apidologie* 26 (1995): 453 – 465.

Persano Oddo L, Piro R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets, *Apidologie* 35 (Suppl. 1), S38–S81.

Philippe J. M. (1999): Le guide de l'apiculteur, 3ème édition: Sarl Edisud, la calade, France.347p.

Piazza MG, Accorti M, Persano Oddo L (1991). Electrical conductivity, ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura*; 7 : 51-63.

Pimentel et al. (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:151.

Podschun R, Ullmann U.(1998) Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin. Microbiol. Rev.* (11: 4); 589-603.

Powers S.K, & Hamilton K. (1999). Antioxidants and exercise. *Clinics in Sports Medicine*, 18, 525-536.

Prlica M. (1938). Uber die baktericide wirkung des naturhonig. *Z Hyg Infekt Krankh* 120:437-43.

Přidal A, Vorlová L.(2002). Honey and its physical parameters. *Czech J. Anim. Sci.*, 47, (10): 439–444.

Puntarulo S. (2005). Iron, oxidative stress and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 299-312.

Radak Z, Chung H.Y, Goto S. (2008a). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology Medicine*. 44:153- 159.

Radak Z, Chung H.Y, Koltai E, et al. (2008b). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews*. 7:34–42.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A. et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231–1237.

Ricardo da Silva J. M, Darmon N, Fernandez Y. et al. (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1549–1552.

Ricciardelli d'Albore G. (1998) Mediterranean melissopalynology, Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi, Perugia.

Salah N, Miller N. J, Paganga G et al. (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(2), 339–346.

Sánchez-Moreno C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 8: 121-137.

Saxena S, Gautam S, Sharma A (2010) Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem* 118: 391-397.

Sela M.O, Shapira L, Grizim I, et al. (1998). Effects of honey consumption on enamel microhardness in normal versus xerostomic patients, *Oral. Rehab.* 25, 630–634.

Sharma O.P, Bhat T.K (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 113: 1201–1205.

Siegenthaler U (1977) Eine einfache und rasche Methode zur Bestimmung der α -Glucosidase(Sacharase) in Honig. *Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg* 68, 251-258.

Silva D.J, Queiroz A.C. (2002): Determinação do nitrogênio total e da proteína bruta. (Eds.) *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, p.57-75.

Singleton V.L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152–178.

Somerfield S.D. (1991) Honey and healing. *Journal of Royal Society of Medicine* 84(3), 179.

Srisayam M, Chantawannakul P (2010) Antimicrobial and antioxidant properties of honeys produced by *Apis Mellifera* in Thailand. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science* 2 (2): 77-83. DOI: 10.3896/IBRA.4.02.2.03.

Stone H. H. & Martin J. D. (1969) Pulmonary injury associated with thermal burns. *Surg. Gynecol. Obstet.* 129, 1242.

Taormina P.J, Niemira B.A, Beuchat L.R.(2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 217–225.

Tara A. (2005). Modification chimique de l'amidon par extrusion réactive. Thèse de doctorat. 436 pages.

- Terrab A, Vega-Pérez J.M, Diez M.J. et al. (2001).** Characterisation of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic- mass spectrometric analysis of their sugar components. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 179–185.
- Theunissen F, Grobler S, Gedalia I (2001)** The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. *Apidologie*. 32:371–379.
- Tysset C. Und Rousseau M.(1981):** Le problème du microbisme et de l'hygiène des miels du commerce, *Rev. Med. vet.*132, 591-600.
- Ultee A, Kets E. P. W. & Smid J. (1999).** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 65, 4606–4610.
- Van ketel B.A. (1892).** Feestnummer der Berichsten van de Nederlandse Maatschappij ter Bevordering der Pharmacie 67/96.
- Vannier P. (1998).**Au pays du miel, Flammarion, 159p.
- Vannier P. (1999).** Miel ; édition Flammarion. 119p.
- Vela L, De Lorenzo C, Pérez R. A. (2007) -** Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *J. Sci. Food Agric.*, 87: 1069-1075.
- Vercauteren R, Rapaille A.(1999).** Sources, modes de production et propriétés technologiques. In: Dossier scientifique de l'IFN n°11 «Les glucides» tome 1.
- Vlayen P. (1995).**Miel et Botulisme. *Les Carnets du CARI*, 46, 14-16.
- Vorlová L. & Elechovská O. (2002).** Activity of enzymes and trace element content in bee honey. *Acta Vet. Brno.* 71, 375–378.
- Vorwohl G. (1964) -** Die Beziehungen zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtsmassigen Herkunft. - *Ann. Abeille* 7(4) : 301 - 309.
- Wactawski-Wende J, Schisterman E.F, Hovey K.M,et al. (2009).** BioCycle Study Group. BioCycle study: design of the longitudinal study of the oxidative stress and hormone variation during the menstrual cycle. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 23(2):171-84.
- Wahdan H.A. (1998).** Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*, 1998 Jan-Feb, 26(1), 26-31.
- Watanabe K, Shinmoto H, Kobori M,et al. (1996)** Growth stimulation with honey royal jelly DIII protein of human lymphocytic cell lines in a serum-free medium., *Biotechnol. Tech.* 10, 959-962.
- Weiss K, (1985).** L'apiculture de week-end édition européennes apicoles Bruxelles. 252p.
- Wellford T.E, Eadie T. & Liewellyn G.C. (1978):** Evaluation the inhibitory action of honey on fungal growth sporulation. In aflatoxin production. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 28: 280-283.

Wen-Chien Ko, Paterson D.L, Anthanasia Jet al. (2002). Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. *Emerging Infectious Diseases*. (8 :2). 160- 166.

Weston R.J, Brocklebank L.K, Lu Y.(2000) Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*.70:427-35.

White J. (1962): cite par lauveaux J: composition, propriétés et technologie du miel in traité de la biologie de l'abeille .Tome 3 les produits de la ruche.

White J. (1979), Spectrophotometric method for hydroxymethyl furfural in honey, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62, pages 509–514.

White J.(1981): Natural honey toxicants. *Bee world* 62, 23-28.

White J.W, Subers M.H.(1964a) Studies on honey Inhibine: 4. Destruction of the peroxide accumulation system by light.*J Food Sci* ;29:819–8.

White J.W, Subers MH (1963) Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay. *J Apic Res* 2, 93-100.

White J.W.(1978) Honey. *Adv Food Res* 24: 287–375.

Yilmaz H,& Küfreviöglu I. (2001): Composition of honeys collected from Eastern and south-Eastern Anatolia and effect of storage on Hydroxymethylfurfural, content and diastase Activity, revue n°: 25, édition: Tübitak. Turk. Agric. PP: 347-349.

Zeina B, Othman O, al-Assad S.(1996). Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro. *J Altern Complement Med*. 1996;2:345–348.

Zeina B, Zohra BI, Assad S. (1997). The effects of honey on Leishmania parasites: an in vitro study. *Trop Doct*. 1997;/ 27(Suppl 1):36–38.

Annexes



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 1

Flore annoncée : multi floral

Lieu de production: Relizane - Algérie

Informations du laboratoire:

Miel n° 1113343

Reçu au laboratoire le 10/11/2011

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **18,05** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **5,0** ± 0,2
pH au point d'équivalence **7,8** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **26,1** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **1,52** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

19,6 ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Analysé le 13/01/2012

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

☉ HMF (mg/kg) **6,5** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

25,3 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 1113343

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	25,20 ± 3,32
Glucose	21,45 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,17

Disaccharides

Maltose + indét.	0,00 ± 1,32
Turanose + indét.	8,83 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	2,23 ± 0,38
Saccharose	4,87 ± 0,10
Tréhalose	1,89 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,00 ± 0,12
Erlose	0,00 ± 0,16
Mélézitose	0,22 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 04/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale	Forte
Pollens dominants	
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	Fabacée (24%), Apiacées (33%), Brassicacées (35%)
Pollens isolés (<10%)	Plantain, Renoncule, Rhamnacées, Cistacée, Ronces, Astéracées
Pollens isolés significatifs	
Elements figurés	

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund) **119** "marron Foncé"
miel cristallisé (Pantone)

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Fluide**

à sa sortie **Fluide**

Cristallisation **Inexistante**

Sablage **None**

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

ODEURS		type d'odeurs
Intensité	moyenne	Chaude Boisée Avancée*

ARÔMES		type d'arôme, évoquant
Intensité	moyenne	
Chaud	2	⇒ Fruits cuits ⇒ mélasse
Floral/fruité		
Frais		
Chimique*		
Boisé	2	⇒ Résiné et épicé
Avancé*	1	⇒ Animal

SAVEURS ET SENSATIONS

SAVEURS	Intensité	moyenne
Sucrée	1	
Acide	2	
Amère	1	
Astringente	2	
Froid		
Piquante	2	

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

1 ⇒ Métal

PERSISTANCE **2**

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 1113343

Vos références: 1

Interprétation des résultats : MW-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES	INFORMATIONS CONSOMMATEURS												
<p>Humidité : Miel légèrement humide</p> <p>HMF: Miel dont le HMF met en évidence une faible dégradation</p> <p>Enzymes : Miel assez riche en saccharase</p> <p>Commentaire : L'origine de la concentration légèrement trop haute en HMF dans cet échantillon est inconnue. L'indice de saccharase étant très haut, la qualité de cet échantillon est jugée satisfaisante</p>	<p>Type de miel : Toutes fleurs</p> <p>Origine botanique : Fabacées, apiacées, brassicacées</p> <p>Origine géographique : Relizane - Algérie</p> <p>Condition pour une conservation optimale à moins de 15°C</p> <p>À consommer de préférence avant fin juin 2012</p>												
<p>ODEURS Intensité</p>													
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;"><input checked="" type="checkbox"/> chaude</td> <td style="width: 33%;"><input type="checkbox"/> chimique*</td> <td style="width: 33%;"><input type="checkbox"/> exogène</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> flor./fruit.</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> boisée</td> <td></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> fraîche</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> avancée*</td> <td></td> </tr> </table>	<input checked="" type="checkbox"/> chaude	<input type="checkbox"/> chimique*	<input type="checkbox"/> exogène	<input type="checkbox"/> flor./fruit.	<input checked="" type="checkbox"/> boisée		<input type="checkbox"/> fraîche	<input checked="" type="checkbox"/> avancée*		<p>Intensité des odeurs moyenne</p>			
<input checked="" type="checkbox"/> chaude	<input type="checkbox"/> chimique*	<input type="checkbox"/> exogène											
<input type="checkbox"/> flor./fruit.	<input checked="" type="checkbox"/> boisée												
<input type="checkbox"/> fraîche	<input checked="" type="checkbox"/> avancée*												
<p>ARÔMES Intensité</p>													
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;"><input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ fruits cuits ⇒ mélasse</td> <td style="width: 30%; text-align: center;"> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Floral/Fruité</td> <td></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Frais</td> <td></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Chimique*</td> <td></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ résiné et épicé</td> <td style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Avancé* ⇒ animal</td> <td style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </td> </tr> </table> <p><small>* Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination exogène</small></p>	<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ fruits cuits ⇒ mélasse	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Floral/Fruité		<input type="checkbox"/> Frais		<input type="checkbox"/> Chimique*		<input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ résiné et épicé	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Avancé* ⇒ animal	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<p>Intensité des arômes moyenne</p> <p>Saveurs et arômes : Miel aux notes de fruits cuits et épicés</p>
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ fruits cuits ⇒ mélasse	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>												
<input type="checkbox"/> Floral/Fruité													
<input type="checkbox"/> Frais													
<input type="checkbox"/> Chimique*													
<input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ résiné et épicé	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>												
<input checked="" type="checkbox"/> Avancé* ⇒ animal	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>												
<p>SAVEURS ET SENSATIONS Intensité</p>													
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 70%;"><input checked="" type="checkbox"/> Sucrée</td> <td style="width: 30%; text-align: center;"> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Acide</td> <td style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Amère</td> <td style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Astringente</td> <td style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Froid</td> <td></td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Piquante</td> <td style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </td> </tr> </table>	<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Acide	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Amère	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Astringente	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Froid		<input checked="" type="checkbox"/> Piquante	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<p>Intensité des saveurs et sensations moyenne</p>
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>												
<input checked="" type="checkbox"/> Acide	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>												
<input checked="" type="checkbox"/> Amère	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>												
<input checked="" type="checkbox"/> Astringente	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>												
<input type="checkbox"/> Froid													
<input checked="" type="checkbox"/> Piquante	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>												
<p>ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES</p> <p>⇒ Métal <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </p>	<p>L'échantillon analysé répond aux normes légales et aux critères de qualité conseillés</p>												
<p>PERSISTANCE</p> <p style="text-align: right;"> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </p>													



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 2
Flore annoncée : Jujubier

Informations du laboratoire:

Miel n° 2113344
Reçu au laboratoire le 10/11/2011

Lieu de production: Saida - Algérie

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apiculture, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **16,04** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **4,1** ± 0,2
pH au point d'équivalence **6,2** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **17,3** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **0,52** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

Non détecté ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Analysé le 13/01/2012

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

☉ HMF (mg/kg) **78,4** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

15,1 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 2113344

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	35,29 ± 3,32
Glucose	26,37 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,34

Disaccharides

Maltose + indét.	5,81 ± 1,32
Turanose + indét.	1,30 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	0,64 ± 0,38
Saccharose	0,00 ± 0,10
Tréhalose	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,05 ± 0,12
Erlose	0,52 ± 0,16
Mélézitose	0,09 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 04/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale	Moyenne
Pollens dominants	Apiacées (48%)
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	Ronces (15%), Brassicacées (16%)
Pollens isolés (<10%)	Renoncule, Astéracées, Lamiacées, Trèfle, Cistacée, Rosacées, Fabacée
Pollens isolés significatifs	Jujubier
Elements figurés	

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund)

miel cristallisé (Pantone)

160

Terre De Sienne

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Tartinable**

à sa sortie **Tartinable**

Cristallisation **Granuleuse**

Sablage

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

ODEURS

Intensité

forte

type d'odeurs

Chaude

Boisée

*Avancée**

ARÔMES

Intensité

moyenne

type d'arôme, évoquant

Chaud

3

⇒ Fruits cuits ⇒ pruneaux

Floral/fruité

Frais

Chimique*

Boisé

3

⇒ Résiné et épicé ⇒ céleri

Avancé*

1

⇒ Animal ⇒ crevette

SAVEURS ET SENSATIONS

SAVEURS

Intensité

forte

Sucrée

2

Acide

2

SENSATIONS

Amère

Astringente

2

Froid

Piquante

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Fumée

PERSISTANCE

3





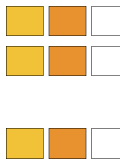

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 2113344

Vos références: 2

Interprétation des résultats : MW-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES		INFORMATIONS CONSOMMATEURS	
Humidité : Miel sec HMF: Miel fort dégradé Enzymes : Miel très pauvre en saccharase Commentaire : L'indice de saccharase très faible ainsi que la teneur en HMF élevée montrent que l'échantillon a subi un traitement thermique inadéquat.		Type de miel : Jujubier dominant Origine botanique : Jujubier dominant Origine géographique : Saida - Algérie	
ODEURS		Intensité 	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> flor./fruit. <input type="checkbox"/> fraîche	<input type="checkbox"/> chimique* <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input checked="" type="checkbox"/> avancée*	<input type="checkbox"/> exogène	Intensité des odeurs forte
ARÔMES		Intensité 	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ fruits cuits ⇒ pruneaux <input type="checkbox"/> Floral/Fruité <input type="checkbox"/> Frais <input type="checkbox"/> Chimique*	<input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ résiné et épicé ⇒ céleri <input checked="" type="checkbox"/> Avancé* ⇒ animal ⇒ crevette		Intensité des arômes moyenne Saveurs et arômes : Miel aux notes boisées et de fruits cuits
<small>* Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination exogène</small>			
SAVEURS ET SENSATIONS		Intensité 	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <input checked="" type="checkbox"/> Acide <input type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante		Intensité des saveurs et sensations forte	
ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES			
⇒ Fumée			
PERSISTANCE			



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 3

Flore annoncée : Eucalyptus

Lieu de production: Mascara - Algérie

Informations du laboratoire:

Miel n° 3113345

Reçu au laboratoire le 10/11/2011

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **13,76** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **4,1** ± 0,2
pH au point d'équivalence **6,3** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **15,2** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **0,47** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

6,5 ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

Analysé le 13/01/2012

☉ HMF (mg/kg) **28,2** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

23,5 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 3113345

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	37,81 ± 3,32
Glucose	26,18 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,44

Disaccharides

Maltose + indét.	7,13 ± 1,32
Turanose + indét.	1,98 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	0,88 ± 0,38
Saccharose	0,54 ± 0,10
Tréhalose	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,00 ± 0,12
Erlose	1,12 ± 0,16
Mélézitose	0,00 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 04/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale	Moyenne
Pollens dominants	
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	Rosacées (13%), Fabacée (23%), Apiacées (24%)
Pollens isolés (<10%)	Chénopodiacées, Convolvulacées, Lamiacées, Malvacées, Plantain, Poacées, Viperines, Eucalyptus, Renoncule, Cistacée, Rhamacées, Ronces, Brassicacées, Astéracées
Pollens isolés significatifs	
Elements figurés	

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund)

miel cristallisé (Pantone)

131

Ocre Jaune Foncé

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Tartinable**

à sa sortie **Tartinable**

Cristallisation **Imperceptible**

Sablage **Très Fin**

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

ODEURS

Intensité

moyenne

type d'odeurs

Chaude

Boisée

Avancée*

ARÔMES

Intensité

moyenne

type d'arôme, évoquant

Chaud

3

⇒ Fruits cuits

Floral/fruité

Frais

Chimique*

2

⇒ Pétrochimique ⇒ caoutchouc

Boisé

3

⇒ Résiné et épice

Avancé*

SAVEURS ET SENSATIONS

SAVEURS

Intensité

moyenne

Sucrée

2

Acide

2

SENSATIONS

Amère

Astringente

2

Froid

Piquante

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE

2



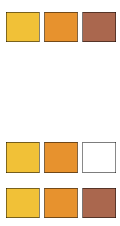

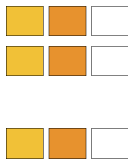

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 3113345

Vos références: 3

Interprétation des résultats : MW-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES		INFORMATIONS CONSOMMATEURS	
<p>Humidité : Miel très sec HMF: Miel fort dégradé</p> <p>Enzymes : Miel pauvre en saccharase</p> <p>Commentaire : L'indice de saccharase très faible ainsi que la teneur en HMF élevée montrent que l'échantillon a subi un traitement thermique inadéquat.</p>		<p>Type de miel : Toutes fleurs</p> <p>Origine botanique : Fabacées, apiacées, eucalyptus</p> <p>Origine géographique : Mascara - Algérie</p> <p>Condition pour une conservation optimale à moins de 15°C</p>	
ODEURS		Intensité 	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> flor./fruit. <input type="checkbox"/> fraîche	<input type="checkbox"/> chimique* <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input checked="" type="checkbox"/> avancée*	<input type="checkbox"/> exogène	Intensité des odeurs moyenne
ARÔMES		Intensité 	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ fruits cuits <input type="checkbox"/> Floral/Fruité <input type="checkbox"/> Frais <input checked="" type="checkbox"/> Chimique* ⇒ pétrochimique ⇒ caoutchouc <input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ résiné et épicé <input type="checkbox"/> Avancé*			Intensité des arômes moyenne Saveurs et arômes : Miel aux notes boisées et de fruits cuits
<small>* Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination exogène</small>			
SAVEURS ET SENSATIONS		Intensité 	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <input checked="" type="checkbox"/> Acide <input type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante			Intensité des saveurs et sensations moyenne
ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES			
⇒ Néant			
PERSISTANCE			



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 4

Flore annoncée : Oranger

Lieu de production: Mascara - Algérie

Informations du laboratoire:

Miel n° 4113346

Reçu au laboratoire le 10/11/2011

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **17,04** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **3,9** ± 0,2
pH au point d'équivalence **6,6** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **10,2** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **0,23** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

4,3 ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

Analysé le 13/01/2012

☉ HMF (mg/kg) **11,8** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

7,6 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 4113346

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	37,64 ± 3,32
Glucose	28,26 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,33

Disaccharides

Maltose + indét.	3,54 ± 1,32
Turanose + indét.	1,61 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	0,00 ± 0,38
Saccharose	0,31 ± 0,10
Tréhalose	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,00 ± 0,12
Erlose	0,30 ± 0,16
Mélézitose	0,00 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 04/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale	Moyenne
Pollens dominants	
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	Apiacées (12%), Lotier (14%), Fabacée (17%), Brassicacées (18%), Orangers (22%)
Pollens isolés (<10%)	Chénopodiacées, Poacées, Acacia, Eucalyptus, Lamiacées, Renoncule, Ronces, Rosacées, Cistacée, Plantain, Astéracées
Pollens isolés significatifs	
Elements figurés	

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund)

miel cristallisé (Pantone)

141 Jaune Paille

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Onctueux**

à sa sortie **Onctueux**

Cristallisation **Granuleuse**

Sablage

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

<u>ODEURS</u>		<u>type d'odeurs</u>
Intensité	moyenne	Chaude Chimique* Boisée
<u>ARÔMES</u>		<u>type d'arôme, évoquant</u>
Intensité	moyenne	
Chaud	2	⇒ Caramélisés ⇒ caramel léger
Floral/fruité		
Frais		
Chimique*	2	⇒ Pétrochimique ⇒ plastique
Boisé	2	⇒ Végétal sec et résiné
Avancé*		

SAVEURS ET SENSATIONS

<u>SAVEURS</u>		<u>moyenne</u>
Intensité		
Sucrée		2
Acide		2
Amère		1
Astringente		2
<u>SENSATIONS</u>		
Froid		
Piquante		

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE

3

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 4113346

Vos références: 4

Interprétation des résultats : MW-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES		INFORMATIONS CONSOMMATEURS	
Humidité : Humidité normale HMF: Miel dégradé Enzymes : Miel très pauvre en saccharase Commentaire : L'indice de saccharase faible ainsi que la teneur en HMF légèrement élevée montrent que l'échantillon a subi un traitement thermique inadéquat. L'indice diastasique est trop faible pour répondre aux normes légales.		Type de miel : Toutes fleurs Origine botanique : Oranger dominant, lotier, apiacées Origine géographique : Mascara - Algérie	
ODEURS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> flor./fruit. <input type="checkbox"/> fraîche	<input checked="" type="checkbox"/> chimique* <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input type="checkbox"/> avancée*	<input type="checkbox"/> exogène	Intensité des odeurs moyenne
ARÔMES		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ caramélisés ⇒ caramel léger			Intensité des arômes moyenne
<input type="checkbox"/> Floral/Fruité			Saveurs et arômes : Miel aux notes boisées
<input type="checkbox"/> Frais			
<input checked="" type="checkbox"/> Chimique* ⇒ pétrochimique ⇒ plastique			
<input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ végétal sec et résiné			
<input type="checkbox"/> Avancé*			
<small>* Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination exogène</small>			
SAVEURS ET SENSATIONS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée			Intensité des saveurs et sensations moyenne
<input checked="" type="checkbox"/> Acide			
<input checked="" type="checkbox"/> Amère			
<input checked="" type="checkbox"/> Astringente			
<input type="checkbox"/> Froid			
<input type="checkbox"/> Piquante			
ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES			
⇒ Néant			
PERSISTANCE			



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 5

Flore annoncée : Eucalyptus

Lieu de production: Tiaret - Algérie

Informations du laboratoire:

Miel n° 5113347

Reçu au laboratoire le 10/11/2011

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **16,14** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **4,1** ± 0,2
pH au point d'équivalence **6,5** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **15,6** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **0,57** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

12,6 ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

Analysé le 13/01/2012

☉ HMF (mg/kg) **9,6** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

26,2 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 5113347

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	37,15 ± 3,32
Glucose	26,39 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,41

Disaccharides

Maltose + indét.	5,79 ± 1,32
Turanose + indét.	1,66 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	0,00 ± 0,38
Saccharose	0,37 ± 0,10
Tréhalose	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,00 ± 0,12
Erlose	0,53 ± 0,16
Mélézitose	0,03 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 04/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale	Forte
Pollens dominants	Eucalyptus (81%)
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	Apiacées (13%)
Pollens isolés (<10%)	Fabacée, Astéracées, Brassicacées
Pollens isolés significatifs	
Elements figurés	

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund)	55	“jaune D’or”
miel cristallisé (Pantone)		

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Fluide**

à sa sortie **Fluide**

Cristallisation **En Cours**

Sablage

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

ODEURS		type d'odeurs
Intensité	moyenne	Chaud Boisée Avancée*

ARÔMES		type d'arôme, évoquant
Intensité	moyenne	
Chaud	3	⇒ Caramélisés
Floral/fruité	1	⇒ Floral
Frais		
Chimique*		
Boisé	2	⇒ Épicé
Avancé*		

SAVEURS ET SENSATIONS

SAVEURS	Intensité	moyenne
Sucrée		2
Acide		2
SENSATIONS		
Amère		
Astringente		2
Froid		
Piquante		

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE

2






INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 5113347

Vos références: 5

Interprétation des résultats : MW-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES		INFORMATIONS CONSOMMATEURS	
Humidité : Miel sec HMF: Miel dont le HMF met en évidence une faible dégradation Enzymes : Teneur en saccharase normale Commentaire :		Type de miel : Eucalyptus dominant Origine botanique : Eucalyptus, apiacées,... Origine géographique : Tiaret - Algérie Condition pour une conservation optimale à moins de 15°C À consommer de préférence avant fin juin 2012	
ODEURS		Intensité 	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> flor./fruit. <input type="checkbox"/> fraîche	<input type="checkbox"/> chimique* <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input checked="" type="checkbox"/> avancée*	<input type="checkbox"/> exogène	Intensité des odeurs moyenne
ARÔMES		Intensité 	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ caramélisés <input checked="" type="checkbox"/> Floral/Fruité ⇒ floral <input type="checkbox"/> Frais <input type="checkbox"/> Chimique* <input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ épicé <input type="checkbox"/> Avancé*	  	Intensité des arômes moyenne Saveurs et arômes :	
SAVEURS ET SENSATIONS		Intensité 	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <input checked="" type="checkbox"/> Acide <input type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante	  	Intensité des saveurs et sensations moyenne	
ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES ⇒ Néant		L'échantillon analysé répond aux normes légales	
PERSISTANCE 			



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 6

Flore annoncée : Oranger

Lieu de production: Tiaret - Algérie

Informations du laboratoire:

Miel n° 6113348

Reçu au laboratoire le 10/11/2011

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apiculture, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **15,87** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **3,7** ± 0,2
pH au point d'équivalence **6,3** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **17** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **0,27** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

3,2 ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

Analysé le 13/01/2012

☉ HMF (mg/kg) **21,4** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

16 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 6113348

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	36,77 ± 3,32
Glucose	21,61 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,70

Disaccharides

Maltose + indét.	7,02 ± 1,32
Turanose + indét.	2,00 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	0,71 ± 0,38
Saccharose	0,30 ± 0,10
Tréhalose	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,00 ± 0,12
Erlose	1,19 ± 0,16
Mélézitose	0,00 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 04/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale	Moyenne
Pollens dominants	Astéracées (41%)
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	Fabacée (31%)
Pollens isolés (<10%)	Rhamacées, Eucalyptus, Rosacées, Renoncule, Ronces, Apiacées, Brassicacées, Lotier
Pollens isolés significatifs	
Elements figurés	

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund)

miel cristallisé (Pantone) **130 Orange**

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Onctueux**

à sa sortie **Onctueux**

Cristallisation **Granuleuse**

Sablage

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

<u>ODEURS</u>		<u>type d'odeurs</u>
Intensité	moyenne	<i>Chaude Boisée Avancée*</i>
<u>ARÔMES</u>		<u>type d'arôme, évoquant</u>
Intensité	moyenne	
Chaud	2	⇒ Caramélisés
Floral/fruité	2	⇒ Floral - Fruité ⇒ acide citrique
Frais	1	⇒ Zeste
Chimique*		
Boisé	2	⇒ Résiné et épicé
Avancé*		

SAVEURS ET SENSATIONS

<u>SAVEURS</u>	Intensité	moyenne
Sucrée		2
Acide		2
<u>SENSATIONS</u>		
Amère		
Astringente		2
Froid		
Piquante		

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE

2

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 6113348

Vos références: 6

Interprétation des résultats : MW-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES		INFORMATIONS CONSOMMATEURS	
Humidité : Miel très sec HMF: Miel fort dégradé Enzymes : Miel très pauvre en saccharase Commentaire : L'indice de saccharase faible ainsi que la teneur en HMF élevée montre que l'échantillon a subi un traitement thermique inadéquat.		Type de miel : Toutes fleurs Origine botanique : Astéracées, fabacées, oranger Origine géographique : Tiaret - Algérie Condition pour une conservation optimale à moins de 15°C	
ODEURS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> flor./fruit. <input type="checkbox"/> fraîche	<input type="checkbox"/> chimique* <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input checked="" type="checkbox"/> avancée*	<input type="checkbox"/> exogène	Intensité des odeurs moyenne
ARÔMES		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ caramélisés <input checked="" type="checkbox"/> Floral/Fruité ⇒ floral - fruité ⇒ acide citrique <input checked="" type="checkbox"/> Frais ⇒ zeste <input type="checkbox"/> Chimique* <input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ résiné et épicé <input type="checkbox"/> Avancé*	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Intensité des arômes moyenne Saveurs et arômes : Miel aux notes acidulées
<small>* Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination exogène</small>			
SAVEURS ET SENSATIONS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <input checked="" type="checkbox"/> Acide <input type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Intensité des saveurs et sensations moyenne
ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES			
⇒ Néant			
PERSISTANCE			
		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 7
Flore annoncée : forêt

Informations du laboratoire:

Miel n° 7113349
Reçu au laboratoire le 10/11/2011

Lieu de production: Tiaret - Algérie

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **14,87** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **4,6** ± 0,2
pH au point d'équivalence **6,5** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **8,3** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **0,51** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

Non détecté ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Analysé le 13/01/2012

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

☉ HMF (mg/kg) **11,1** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

11 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 7113349

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	33,92 ± 3,32
Glucose	25,78 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,32

Disaccharides

Maltose + indét.	8,45 ± 1,32
Turanose + indét.	2,23 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	1,27 ± 0,38
Saccharose	0,68 ± 0,10
Tréhalose	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,00 ± 0,12
Erlose	1,87 ± 0,16
Mélézitose	0,00 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 04/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale	Forte
Pollens dominants	Rhamnacées (47%)
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	Astéracées (17%), Eucalyptus (18%)
Pollens isolés (<10%)	Lamiacées, Lotier, Vesce, Ronces, Brassicacées, Rosacées, Apiacées, Fabacée
Pollens isolés significatifs	
Elements figurés	

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund) **51** "jaune Paille"
miel cristallisé (Pantone)

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Fluide**

à sa sortie **Fluide**

Cristallisation **Inexistante**

Sablage

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

ODEURS		type d'odeurs
Intensité	moyenne	Chauve Boisée Avancée*

ARÔMES		type d'arôme, évoquant
Intensité	moyenne	
Chaud	2	⇒ Doux ⇒ vanille
Floral/fruity	2	⇒ Floral - Fruité
Frais		
Chimique*		
Boisé	2	⇒ Épicé
Avancé*		

SAVEURS ET SENSATIONS

SAVEURS	Intensité	moyenne
Sucrée	2	
Acide	2	
Amère		
Astringente	1	
Froid		
Piquante		

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE **1**

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 7113349

Vos références: 7

Interprétation des résultats : MW-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES		INFORMATIONS CONSOMMATEURS	
Humidité : Miel très sec HMF: Miel dégradé Enzymes : Miel très pauvre en saccharase Commentaire : L'indice de saccharase faible ainsi que la teneur en HMF élevée montrent que l'échantillon a subi un traitement thermique inadéquat.		Type de miel : Astéracées (chardon), Origine botanique : Toutes fleurs Origine géographique : Tiaret - Algérie Condition pour une conservation optimale à moins de 15°C À consommer de préférence avant fin juin 2012	
ODEURS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> flor./fruit. <input type="checkbox"/> fraîche	<input type="checkbox"/> chimique* <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input checked="" type="checkbox"/> avancée*	<input type="checkbox"/> exogène	Intensité des odeurs moyenne
ARÔMES		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ doux ⇒ vanille <input checked="" type="checkbox"/> Floral/Fruité ⇒ floral - fruité <input type="checkbox"/> Frais <input type="checkbox"/> Chimique* <input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ épicé <input type="checkbox"/> Avancé*	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Intensité des arômes moyenne Saveurs et arômes : Miel doux aux notes de vanille
SAVEURS ET SENSATIONS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <input checked="" type="checkbox"/> Acide <input type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Intensité des saveurs et sensations moyenne L'échantillon analysé répond aux normes légales
ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES ⇒ Néant			
PERSISTANCE		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 8

Flore annoncée : Eucalyptus

Lieu de production: Tiaret - Algérie

Informations du laboratoire:

Miel n° 8113350

Reçu au laboratoire le 10/11/2011

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apiculture, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **14,68** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **4,0** ± 0,2
pH au point d'équivalence **6,4** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **11,3** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **0,38** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

Non quantifié ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

Analysé le 13/01/2012

☉ HMF (mg/kg) **9,8** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

26 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 8113350

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	36,84 ± 3,32
Glucose	28,84 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,28

Disaccharides

Maltose + indét.	7,01 ± 1,32
Turanose + indét.	2,13 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	0,64 ± 0,38
Saccharose	1,41 ± 0,10
Tréhalose	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,00 ± 0,12
Erlose	1,10 ± 0,16
Mélézitose	0,00 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 04/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale	Forte
Pollens dominants	Eucalyptus (87%)
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	
Pollens isolés (<10%)	Plantain, Renoncule, Viperine, Apiacées, Brassicacées, Cistacée, Citrus, Ronces, Fabacée, Astéracées, Rosacées
Pollens isolés significatifs	
Elements figurés	

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund) **71** "jaune Orangé"
miel cristallisé (Pantone)

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Fluide**

à sa sortie **Fluide**

Cristallisation **Inexistante**

Sablage **Inexistant**

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

ODEURS		type d'odeurs
Intensité	moyenne	Chaud Boisée Avancée*

ARÔMES		type d'arôme, évoquant
Intensité	moyenne	
Chaud	3	⇒ Caramélisés
Floral/fruité		
Frais		
Chimique*		
Boisé	1	⇒ Résiné
Avancé*	1	⇒ Animal

SAVEURS ET SENSATIONS

SAVEURS	Intensité	moyenne
Sucrée	2	
Acide	2	
Amère	1	
Astringente	1	
Froid		
Piquante		

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE

2

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 8113350

Vos références: 8

Interprétation des résultats : MW-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES		INFORMATIONS CONSOMMATEURS	
<p>Humidité : Miel très sec</p> <p>HMF: Miel dont le HMF met en évidence une faible dégradation</p> <p>Enzymes : Miel très pauvre en saccharase</p> <p>Commentaire : L'indice de saccharase faible montre que l'échantillon a subi un traitement thermique inadéquat.</p>		<p>Type de miel : Eucalyptus</p> <p>Origine botanique : Eucalyptus</p> <p>Origine géographique : Tiaret - Algérie</p> <p>Condition pour une conservation optimale à moins de 15°C</p> <p>À consommer de préférence avant fin déc. 2012</p>	
ODEURS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> flor./fruit. <input type="checkbox"/> fraîche	<input type="checkbox"/> chimique* <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input checked="" type="checkbox"/> avancée*	<input type="checkbox"/> exogène	Intensité des odeurs moyenne
ARÔMES		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ caramélisés <input type="checkbox"/> Floral/Fruité <input type="checkbox"/> Frais <input type="checkbox"/> Chimique*	<input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ résiné <input checked="" type="checkbox"/> Avancé* ⇒ animal		Intensité des arômes moyenne Saveurs et arômes : Miel aux notes caramélisées et résinées
<small>* Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination exogène</small>			
SAVEURS ET SENSATIONS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <input checked="" type="checkbox"/> Acide <input checked="" type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante			Intensité des saveurs et sensations moyenne
ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES			
⇒ Néant			
PERSISTANCE			



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 9

Flore annoncée : Oranger

Lieu de production: Relizene - Algérie

Informations du laboratoire:

Miel n° 9113351

Reçu au laboratoire le 10/11/2011

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **16,30** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **4,0** ± 0,2
pH au point d'équivalence **6,6** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **9,9** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **0,20** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

Non détecté ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

Analysé le 13/01/2012

☉ HMF (mg/kg) **7,6** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

7,3 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 9113351

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	35,41 ± 3,32
Glucose	27,24 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,30

Disaccharides

Maltose + indét.	4,72 ± 1,32
Turanose + indét.	1,30 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	0,00 ± 0,38
Saccharose	1,22 ± 0,10
Tréhalose	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,00 ± 0,12
Erlose	0,00 ± 0,16
Mélézitose	0,09 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 04/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale **Moyenne**

Pollens dominants

Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %) **Astéracées (13%), Apiacées (23%), Brassicacées (25%), Oranger (27%)**

Pollens isolés (<10%) **Acacia, Rosacées, Cistacée, Lamiacées, Renoncule, Ronces, Fabacée, Eucalyptus**

Pollens isolés significatifs

Elements figurés

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund)

miel cristallisé (Pantone) **616 Ivoire Grisé**

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Tartinable**

à sa sortie **Tartinable**

Cristallisation **Granuleuse**

Sablage

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

ODEURS		type d'odeurs
Intensité	moyenne	Chaude Flor./fruit. Boisée

ARÔMES		type d'arôme, évoquant
Intensité	moyenne	
Chaud	2	⇒ Doux
Floral/fruité	2	⇒ Floral ⇒ fleur d'oranger
Frais		
Chimique*		
Boisé	1	⇒ Végétal sec
Avancé*		

SAVEURS ET SENSATIONS

SAVEURS	Intensité	moyenne
Sucrée		2
Acide		1
SENSATIONS		
Amère		
Astringente		1
Froid		
Piquante		

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE

2

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 9113351

Vos références: 9

Interprétation des résultats : MW-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES		INFORMATIONS CONSOMMATEURS	
<p>Humidité : Miel sec</p> <p>HMF: Miel dont le HMF met en évidence une faible dégradation</p> <p>Enzymes : Miel très pauvre en saccharase</p> <p>Commentaire :</p> <p>L'indice de saccharase faible montre que l'échantillon a subi un traitement thermique inadéquat. L'indice diastasique est trop faible pour répondre aux normes légales.</p>		<p>Type de miel : Oranger</p> <p>Origine botanique : Oranger</p> <p>Origine géographique : Relizene - Algérie</p>	
ODEURS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input checked="" type="checkbox"/> flor./fruit. <input type="checkbox"/> fraîche	<input type="checkbox"/> chimique* <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input type="checkbox"/> avancée*	<input type="checkbox"/> exogène	Intensité des odeurs moyenne
ARÔMES		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ doux <input checked="" type="checkbox"/> Floral/Fruité ⇒ floral ⇒ fleur d'oranger <input type="checkbox"/> Frais <input type="checkbox"/> Chimique* <input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ végétal sec <input type="checkbox"/> Avancé*	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Intensité des arômes moyenne Saveurs et arômes : Miel doux aux notes florales
SAVEURS ET SENSATIONS		Intensité	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <input checked="" type="checkbox"/> Acide <input type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Intensité des saveurs et sensations moyenne
ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES			
⇒ Néant			
PERSISTANCE			
		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	



Rapport d'essai



Accrédité selon la norme
ISO 17025
Certificat n°312-TEST

CARI ASBL

4, Place Croix du Sud
B - 1348 Louvain-la-Neuve
BELGIQUE
Tél. : +32 (0)10/47 34 16
Fax. : +32 (0)10/47 34 94
e-mail : info@cari.be
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 30/01/2012

MOUSSA Ahmed
Cité Mohamed Djahlene, bâtiment 5 n° 5

14000 TIARET
ALGERIE

Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 10
Flore annoncée : Harmala

Informations du laboratoire:

Miel n° 10113352
Reçu au laboratoire le 10/11/2011

Lieu de production: Tiaret - Algérie

1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats MW

a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

☉ Humidité (%) **16,24** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 20/12/2011

Seuil conseillé ≤ 18 %
Norme légale ≤ 20 %

☉ pH et acidité

pH **4,2** ± 0,2
pH au point d'équivalence **6,7** ± 0,3
Acidité libre (AL) (méq/kg) **9,7** ± 1,05 (si AL < 40)
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Acidité libre :
Norme légale ≤ 50

Analysé le 22/12/2011

☉ Conductivité (mS/cm) **0,28** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 23/12/2011

Norme légale
Miel de miellat ≥ 0,8

☉ Indice de saccharase

4,6 ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

Analysé le 13/01/2012

Seuil conseillé
IS > 10
et si IS < 10,
ID/IS ≤ 2,5

☉ HMF (mg/kg) **3,8** ± 1,9

Méthode Winkler

non détecté: HMF ≤ 1,2

non quantifié: 1,2 < HMF ≤ 3,5

Analysé le 12/01/2012

Norme légale
HMF ≤ 40
miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

16,4 ± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

Analysé le 27/01/2012

Norme légale
ID > 8
ou miel d'agrumes...
ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

b) Essai non accrédité

Miel n° 10113352

☉ Sucres (% matière fraîche)

Monosaccharides

Fructose	35,18 ± 3,32
Glucose	30,95 ± 2,14
Fructose/Glucose	1,14

Disaccharides

Maltose + indét.	7,10 ± 1,32
Turanose + indét.	0,68 ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	0,00 ± 0,38
Saccharose	0,00 ± 0,10
Tréhalose	0,00 ± 0,10
Gentiobiose	0,00
Palatinose	0,00 ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 06/01/2012

Trisaccharides

Raffinose	0,00 ± 0,12
Erlose	0,45 ± 0,16
Mélézitose	0,00 ± 0,40
Maltotriose	0,00 ± 0,32
Panose	0,00 ± 0,59
Isomaltotriose	0,00 ± 0,09

2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 05/01/2012

☉ Analyse pollinique

Densité générale	Moyenne
Pollens dominants	Astéracées (62%)
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	Rosacées (11%), Brassicacées (16%)
Pollens isolés (<10%)	Lamiacées, Vesce, Apiacées, Chénopodiacées, Eucalyptus, Fabacée, Ronces
Pollens isolés significatifs	
Elements figurés	

3. Examen organoleptique (non accrédité)

3.1. Présentation

Examen visuel

Couleur:

miel liquide (Pfund)

miel cristallisé (Pantone)

142 Paille Foncée

Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire **Tartinable**

à sa sortie **Tartinable**

Cristallisation **Granuleuse**

Sablage

3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

*Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination

ODEURS		type d'odeurs
Intensité	moyenne	Chaude Flor./fruit. Boisée

ARÔMES		type d'arôme, évoquant
Intensité	moyenne	
Chaud	2	⇒ Doux
Floral/fruité	2	⇒ Floral ⇒ fleur d'oranger
Frais		
Chimique*		
Boisé	1	⇒ Végétal sec
Avancé*		

SAVEURS ET SENSATIONS

SAVEURS	Intensité	moyenne
Sucrée		2
Acide		1
SENSATIONS		
Amère		
Astringente		1
Froid		
Piquante		

ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE

1

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 10113352

Vos références: 10

Interprétation des résultats : MW-EB

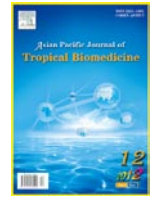
INFORMATIONS TECHNIQUES	INFORMATIONS CONSOMMATEURS
<p>Humidité : Miel sec</p> <p>HMF: Miel dont le HMF ne met pas en évidence de dégradation</p> <p>Enzymes : Miel très pauvre en saccharase</p> <p>Commentaire : Aucun pollen de peganum Harmala n'a été retrouvé dans ce miel. L'indice de saccharase faible montre que l'échantillon a subi un traitement thermique inadéquat.</p>	<p>Type de miel : Astéracées (chardon), Origine botanique : Toutes fleurs</p> <p>Origine géographique : Tiaret - Algérie</p> <p>Condition pour une conservation optimale à moins de 20°C</p> <p>À consommer de préférence avant fin juin 2012</p>
<p>ODEURS Intensité</p>	
<p> <input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> chimique* <input type="checkbox"/> exogène <input checked="" type="checkbox"/> flor./fruit. <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input type="checkbox"/> fraîche <input type="checkbox"/> avancée* </p>	<p>Intensité des odeurs moyenne</p>
<p>ARÔMES Intensité</p>	
<p> <input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ doux ■ ■ □ <input checked="" type="checkbox"/> Floral/Fruité ⇒ floral ⇒ fleur d'oranger ■ ■ □ <input type="checkbox"/> Frais <input type="checkbox"/> Chimique* <input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ végétal sec ■ □ □ <input type="checkbox"/> Avancé* </p> <p><small>* Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination exogène</small></p>	<p>Intensité des arômes moyenne</p> <p>Saveurs et arômes : Miel doux aux notes florales</p>
<p>SAVEURS ET SENSATIONS Intensité</p>	
<p> <input checked="" type="checkbox"/> Sucrée ■ ■ □ <input checked="" type="checkbox"/> Acide ■ □ □ <input type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente ■ □ □ <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante </p>	<p>Intensité des saveurs et sensations moyenne</p>
<p>ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES</p> <p>⇒ Néant</p>	<p>L'échantillon analysé répond aux normes légales</p>
<p>PERSISTANCE</p> <p style="text-align: right;">■ □ □</p>	

TRAVAUX SCIENTIFIQUES



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtb

Document heading

doi:

© 2013 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. All rights reserved.

In vitro activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity

Moussa Ahmed^{*}, Noureddine Djebli, Saad Aissat, Abdelmalek Meslem, Salima Bacha

Pharmacognosy and Api-Phytotherapy Researches Laboratory, Mostaganem University, Algeria

PEER REVIEW

Peer reviewer

Dr. Shyamapada Mandal, Associate Professor, Laboratory of Microbiology and Experimental Medicine, Department of Zoology, University of Gour Banga, Malda-732103, India. E-mail: samtropmed@gmail.com

Comments

The authors reported synergistic interaction between two natural non-toxic agents, honey and curcuma, against *R. mucilaginosa*. The current findings are suggestive to prepare treatment regimen from the components of these two agents for *in vivo* application in order to combat antifungal resistance.

Details on Page

ABSTRACT

Objective: To evaluate the *in vitro* activity and synergism of the combinations of natural honey and curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with total phenolic, flavonoid contents, and diastase activity.

Methods: The Folin-Ciocalteu test was used to determine the total polyphenols content and the flavonoid content was analyzed using by the aluminum chloride method. The antifungal activity of the natural honey, determined by an agar well diffusion assay and agar incorporation method.

Results: Total phenolic content varied from (63.93±0.11) to (95.36±6.08) mg GAE/100 g honey as gallic acid equivalent. Total flavonoids content varied from (5.41±0.04) to (9.94±0.54) mg CE/100 g. Diastase activity values were between (7.3±2.8) and (26±2.8). The zone inhibition diameter for the six honey samples without starch ranged between 6 and 20 mm. When starch was mixed with honey and then added to well, a zone inhibition increase diameter 7 and 21 mm. The percentage increase was noticed with each variety and it ranged between 5% and 62.5%. The minimal inhibitory concentrations for the six varieties of honey without starch against *Rhodotorula mucilaginosa* ranged between 28% and 36% (v/v). When starch was incubated with honey and then added to media, a minimal inhibitory concentration drop has been noticed with each variety. It ranged between 6.66 % and 20% (w/v). No significant correlation was established between diastase activity and bioactive compounds.

Conclusions: The mixture of curcuma starch and honey could lead to the development of new combination antibiotics against *Rhodotorula* infections

KEYWORDS

Bioactive Compounds, Diastase number, *Rhodotorula mucilaginosa*, Honey, Curcuma starch

1. Introduction

Fungi have emerged over the past two decades as major causes of human infections, especially among immunocompromised hosts, having an enormous impact on morbidity and mortality^[1,2]. Antifungal resistance, increasing costs, hospitalization time, and treatment

difficulties of *Rhodotorula* infections are worldwide problems. Therefore, novel fungal therapies for effective management of *Rhodotorula* infection are urgently required. The use of natural products with therapeutic properties is as ancient as human civilization, and for a long time, mineral, plant and animal products were the main sources of drugs^[3]. Honey is a natural product

^{*}Corresponding author: Dr. Ahmed Moussa, Pharmacognosy and Api-Phytotherapy Researches Laboratory, Mostaganem University, Algeria.

Tel/Fax: +213 65234059

E-mail: moussa7014@yahoo.fr

Foundation Project: Supported by the Algerian Ministry of the higher education and scientific research, CNEPRU project approved in 2011/2013 (Grant No. F023 2009/0009).

Article history:

Received Jun 28 2013

Received in revised form 3 Jul, 2nd revised form 9 Jul, 3rd revised form 15 Jul 2013

Accepted 29 Aug 2013

Available online 28 Oct 2013

that is used for its antifungal activity^[4,5]. Honey is one of the most complex mixtures of carbohydrates and other smaller components produced in nature. Sugars are the main constituents of honey, comprising about 95% of honey dry weight. The diastatic activity (α -amylase) in honey is considered a quality factor. Alpha-amylase in honey is also affected by storage time and temperature. Alpha-amylase degrades starch to a mixture of the disaccharide maltose, the trisaccharide maltotriose. Diastase activity is expressed as the diastase number in Schade units and is defined as follows: one diastase unit corresponds to the enzyme activity of 1 g of honey, which can hydrolyse 0.01 g of starch in 1 h at 40 °C^[6]. Therefore, it is expected that adding starch, which is the substrate of the diastase, to honey will subsequently increase the antimicrobial effect of honey^[7]. Polyphenols are another important group of compounds with respect to appearance and functional properties. About 56 to 500 mg/kg total polyphenols were found in different honey types, depending on the honey type^[8,9]. Recently, it was found that the bioactive compounds of honey consisted of flavonoids and phenolic acid. The flavonoid content can vary between 2 and 46 mg/kg of honey and was higher in samples produced during dry season with high temperatures^[10]. The polyphenols are responsible for the antimicrobial properties of honey. The inhibitory effects of polyphenols for α -amylases have attracted great interest among researchers^[11,12]. Novel combinations of honey and curcuma starch may provide a new therapeutic option for *Rhodotorula mucilaginosa* (*R. mucilaginosa*) infections. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of honey alone and in combination with curcuma starch against *R. mucilaginosa* and their correlation with bioactive compounds (total polyphenol and total flavonoid contents) and diastase number (α -amylase).

2. Materials and methods

2.1. Honey samples

The total numbers of 6 honey samples were obtained from Algeria [Tiaret, 3 samples (H3, H4 H6); Saida, 1 sample (H1); Relizane, 1 sample (H5) and Mascara, 1 sample (H2)]. All samples were transferred to the laboratory, stored in amber flasks, and kept at 4 °C until analysis.

2.2. Preparation of the stock starch solution

The stock starch solution was prepared by dissolving 0.5 g of dried soluble starch in deionised water in a volumetric flask. After heating and stirring the solution for approximately 10 min, starch was completely dissolved, and the volumetric flask was filled with deionized water to the mark.

2.3. Culture media and inoculum standardization

R. mucilaginosa were maintained on Sabouraud dextrose agar (SDA) (Merck, Germany) at 4 °C, and sub cultures were performed prior to each experiment in the same medium for 48 h at 35 °C. Turbidity standard and preparation of inocula: Stock fungal inoculum suspensions were prepared in sterile saline from 48 h cultures on SDA at 35 °C. Each suspension was adjusted visually to 0.5 McFarland turbidity standard. Dilutions of these suspensions were subcultured on SDA to determine the number of UFC/mL. The adjusted inoculum was (1×10^6 – 5×10^6 UFC/mL).

2.4. Physicochemical analyses

All physicochemical tests were performed in triplicate.

2.4.1. Bioactive compounds

2.4.1.1. Total flavonoids content

The total flavonoid content was determined using the aluminium chloride assay according to Amaral *et al.*^[13]. A 10 μ L volume of a 10% (v/v) honey solution was added to the wells of a 96 well plate; then 30 μ L of a 2.5% sodium nitrite, 20 μ L of 2.5% aluminium chloride solutions and then 100 μ L of a 2% sodium hydroxide solution were sequentially added. The samples were mixed well and the absorbance at 450 nm was measured. Total flavonoid content was expressed as mg of (+)-catechin equivalents (mg CE/kg of honey).

2.4.1.2. Total phenolic content

The total phenolic content was determined by the Folin–Ciocalteu method^[14]. About 30 μ L of honey solution (0.1 g/mL) was mixed with 2.37 mL of milli Q water and 150 μ L of 0.2 N Folin–Ciocalteu reagent. The solution was thoroughly mixed by vortexing and incubated for 2 min at ambient temperature. A total of 450 μ L of sodium carbonate solution (0.2 g/mL) was added to the reaction mixture and further incubated for 2 h at ambient temperature. The absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer. The total phenolic content was determined by comparing with a standard curve prepared using gallic acid (0–200 mg/L). The results were mean \pm SD and expressed as milligrams of gallic acid equivalents (mg GAE)/100 g of honey.

2.4.2. Diastase activity (diastase number)

The diastase activity was measured using the Phadebas method for α -amylase. Phadebas is a synthetic reagent which produces a blue colour when it is hydrolysed by the diastase. The absorbance at 620 nm was directly proportional to the diastase activity in the honey sample. Results were expressed in Schade units per gram of honey, defined as that amount of the enzyme which would convert 0.01 g of starch into the prescribed end point in 1 h at 40 °C under test conditions^[6].

2.5. Test assays for antifungal activity

2.5.1. Agar well diffusion assay

Honeys were screened for their antifungal activity, according to the agar well diffusion method proposed by the NCCLS[15]. Briefly, solid medium diffusion procedure using wells in dishes was used to determine the anti-yeast activity of the honey. Petri plates (90 mm) were prepared by pouring 20 mL of SDA and allowed to solidify; 0.1 mL of the *R. mucilaginosa* suspensions were poured and uniformly spread. After inoculum absorption by agar, wells were made using sterile glass tubes (6 mm diameter) which were filled with. About 20 μ L of test honey was added to each well. Plates were incubated at 35 °C for 48 h. A diffusion control of starch was used. Second step a mixture of starch–honey was prepared and incubated for 1 h at 35 °C. After inoculation, 6 mm diameter wells were cut into the surface of the agar using a sterile cork borer. About 20 μ L of mixture (honey and starch) were added to each well. Zones of inhibition were measured using a vernier caliper. The diameter of zones, including the diameter of the well, was recorded. Bioassay was performed in duplicate and repeated twice. The results were expressed in terms of the diameter of the inhibition zones: <5.5 mm, inactive; 5.5–9.0 mm, very low activity; 9.0–12.0 mm, low activity; 12.0–15.0 mm, average activity; and >15.0 mm, high activity.

2.5.2. MICs and minimum additive inhibitory concentrations (MAICs) determinations testing

Increased concentrations (1%–30% v/v) were incorporated into media to test their efficiency against *R. mucilaginosa*. Each plate with final volume of honey and media of 5 mL was inoculated and incubated at 35 °C for 48 h. The MICs was determined by finding the plates with the lowest concentration of honey on which the strain would not grow. All MICs values were expressed in % (v/v). After determination of MICs of honey, various concentrations of honey below their MICs were prepared. Mixtures of honey and starch were prepared by mixing various concentrations of honey with various concentrations of starch. To evaluate the effect of starch on the antifungal action of honey, 1% starch solution was prepared using sterile water. Different volumes from the stock solution were added to a range of honey concentrations lower than the MICs. The same volume of starch solution that has given inhibition with honey was added alone to media as control to check whether or not starch alone has an inhibition effect against *R. mucilaginosa*. An equivalent volume of water was added to honey instead of starch solution to confirm that additive inhibition was not due to the dilution of honey. The final volume in each plate was 5 mL. Starch content in media ranged between 1% and 8% (w/v). Honey and starch as well as honey and water were incubated for 48 h at 35 °C before being incorporated into media. Plates were inoculated and incubated at 35 °C for

48 h. Bioassay was performed in duplicate and repeated twice[16].

2.6. Statistical analysis

Each honey was analyzed in triplicate. Results are shown as mean values and standard deviation. Correlations were established using Pearson's correlation coefficient (r) in bivariate linear correlations ($P < 0.01$). All statistical analyses were performed with the Statistica 7.0 software for Windows.

3. Results

3.1. Physicochemical parameters

Figure 1 shows the mean \pm SD, maximum and minimum values of the physicochemical parameters analysed. The honey samples analyzed in the present work showed a range of values, between 26 and 7.3 Schade units. One sample (H5) showed values below 8 Schade units (Figure 1).

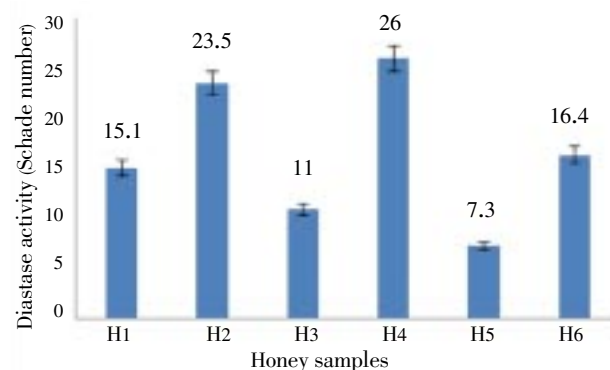


Figure 1. Diastase activity of the honey samples (mean \pm SD; $n=3$).

The explanation for the low content of diastatic activity found in this one sample could be accounted for an inadequate processing or storage conditions. The phenolic concentrations of all honey varieties were estimated as mg of GAE/100 g honey. The total polyphenol content ranged from (63.93 \pm 0.11) to (95.36 \pm 6.08) mg GAE/100 g honey and the total flavonoid content varied from (5.41 \pm 0.04) to (9.94 \pm 0.54) mg CE/100 g honey (Figures 2 and 3).

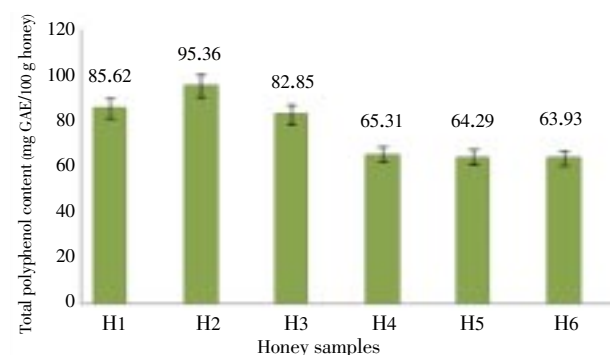


Figure 2. Total phenolic content of six honey samples (mean \pm SD; $n=3$).

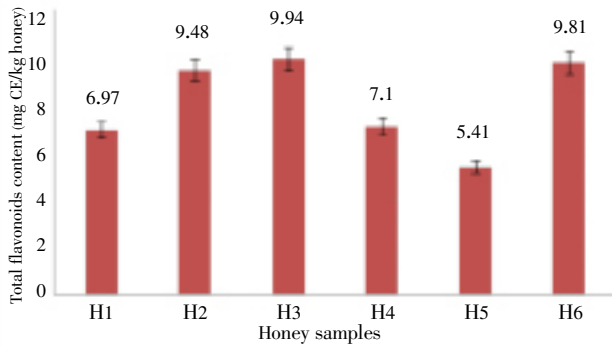


Figure 3. Total flavonoid content of six honey samples (mean±SD; n=3).

3.2. Agar well diffusion assay

Initial screening with the agar well diffusion assay demonstrated that all tested honeys alone and in combination with curcuma starch had antimycotic action against *R. mucilaginosa*. The antimycotic action of honey samples decreased in the following order: H5 >H4>H3>H2>H6>H1 (Table 1).

Table 1

Effects of honey and curcuma starch alone and in combination on *R. mucilaginosa* at 35 °C for 2–day incubation.

Samples	Honey only		Honey and starch			
	ZID (mm [*])	MIC %	ZIID (mm [*])	IP %	MAIC %	MIC drop %
H1	20	28	21	5.00	26	7.14
H2	14	30	16	14.28	24	20.00
H3	8	36	13	62.50	32	11.11
H4	10	34	11	10.00	28	17.64
H5	6	30	7	16.66	26	13.33
H6	18	30	20	11.11	28	6.66

ZID: zone inhibition diameter; ZIID: zone inhibition increase diameter; IP: increase percentage; MIC: minimum inhibitory concentration; MIAC: minimum additive inhibitory concentration. *: <5.5 mm, inactive; 5.5–9.0 mm, very low activity; 9.0–12.0 mm, low activity; 12.0–15.0 mm, average activity; and >15.0 mm, high activity.

No zone of inhibition was determined with starch alone. Without starch, the zone inhibition diameter of the six varieties ranged between 6 and 20 mm. When starch was incubated with honey and added to well, the zone inhibition increase diameter of the six varieties ranged between 7 and 21 mm which represented an increase percentage between 5% and 16.66%.

3.3. Determination of MIC and MAICs

Without starch, the MICs of tested honeys against *R. mucilaginosa* was variable [28%–36% (v/v)]. When starch was incubated with honey and added to media, the MAICs of the five varieties ranged between 24%–32% (v/v) which represented an MIC drop between 6.66%–20% (w/v) (Table 1).

4. Discussion

Rhodotorula species are emerging opportunistic pathogens, particularly in immunocompromised patients. The management of *Rhodotorula* infections faces a number of problems including limited number of effective antifungal drugs, toxicity of the available antifungal drugs, resistance of *Rhodotorula* to commonly used antifungal drugs, relapse of *Rhodotorula* infections and the high cost of antifungal drugs[17,18]. The difficulties associated with the management of *Rhodotorula* infections necessitate the discovery of new antifungal agents in order to increase the spectrum of activity against *Rhodotorula* and combat strains expressing resistance to the available antifungal drugs. In recent years, interest in the application of honey in the treatment of infectious diseases has notably increased. Although several *in vitro* studies have demonstrated the antibacterial activity of honey[19,20], limited numbers of studies have examined the activity of honey against fungi. In a recent study, the antimycotic activities of Slovenian honeys toward five types of fungi (*Aureobasidium pullulans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cladosporium cladosporioides* and *Rhodotorula mucilaginosa*) inhibited only at honey concentrations greater than 50%[21].

Khosravi *et al.* reported that honey had antifungal activity against *Candida* species such as *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata*, and *Candida dubliniensis*[22]. DeMera and Angert reported that honeys from different phytogeographic regions varied in their ability to inhibit the growth of yeasts, suggesting that botanical origin plays an important role in influencing the antifungal activity[23]. Honey produced from Algeria flora has the potential for therapeutic use, firstly because a number of floral sources produce active honey[24,25]. The antifungal effects of Algerian honey toward *C. albicans* and *R. mucilaginosa* were evaluated *in vitro*. In a recent study, Ahmed *et al.* found that the MICs of four varieties of honey without ginger starch against *C. albicans* was 38% and 42%, respectively[26]. When starch was incubated with honey and then added to media, the MICs for *C. albicans* were 32% and 36%. Diastase is a natural enzyme of honey. Its level depends upon geographic and floral origins of the product, as well as on its freshness[27]. The α-amylase present in honey hydrolyzed the starch chains to randomly produce dextrin and maltose. This increased the osmotic effect of the media, which consequently increased the antifungal activity[28]. Molan has studied sugar syrups of the same water activity as honey and found them to be less effective than honey at inhibiting microbial growth *in vitro*[29]. It was found that solutions of high osmolarity, such as honey, glucose, and sugar pastes, inhibit microbial growth because the sugar molecules tie up water molecules so that bacteria have insufficient water to grow[30]. The phenolic constitutes an

important group of compounds for the appearance and for the functional properties of honey. They are recognised as having high scientific and therapeutic interest^[31]. In recent years, a large number of studies have been done on the antifungal activity of phenolic compounds of natural origin. Phenolics compounds of honey have been shown to exhibit antifungal activities^[21]. Also, flavonoids are abundant class of natural phenolic compounds with several biological activities. Koc *et al.* assessed the *in vitro* antifungal activity of four Turkish honey samples from different botanical origin against *Trichosporon* spp. and *Candida* spp. and concluded that multifloral honey had the highest antifungal activity and it probably contains the highest total phenolic content^[32]. The total phenolic contents vary between different honey samples depending on the geographical location of the different floral sources, such as Algeria, Libya and Turkey^[33–35]. Polyphenols and their derivatives have been reported to exhibit inhibitory activity against α -amylase. Lo Piparo *et al.* investigated the interactions between flavonoids and human α -amylase in order to understand the molecular requirement for enzyme inhibition^[36]. No significant correlation was established between diastase activity and total phenolic contents ($r=0.24$).

In the present study, natural honey and curcuma starch of combination showed synergism against *R. mucilaginosa*. Thus, the mixture of natural honey and curcuma could lead to the development of new combination antibiotics against *R. mucilaginosa* infection. Further studies are warranted to explore the mechanism behind the antifungal activity of natural honey and curcuma starch.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors are thankful to staff of Mostaganem University for providing material. This work was supported by the Algerian Ministry of the Higher Education and Scientific Research, CNEPRU project approved in 2011/2013 (Grant No. F023 2009/0009).

Comments

Background

The development of antifungal resistance among pathogenic fungus prompted the need of preparation of cost effective treatment regimen with non-antibiotic drugs, such as honey and curcuma, against *R. mucilaginosa*, and the current attempt to determine natural therapeutics is scientific and timely.

Research frontiers

The synergistic interaction between two natural agents (non-toxic) against *R. mucilaginosa* may be helpful for humankind, particularly in this part of the globe, in combating antifungal resistance.

Related reports

Several authors from different parts of the world explored time to time the antifungal role of natural agents against resistant fungal pathogens in order to search the natural sources of non-antibiotic drugs, which are cost effective and development of resistance against.

Innovations and breakthroughs

The tested agents may be considered in clinical use, but their dose determination (alone and in combination) is mandatory in order to get results in therapy.

Applications

The two agents used in the current study showed synergistic activity against *R. mucilaginosa*, and hence they can be applied against MDR *R. mucilaginosa* as effective therapeutic agents.

Peer review

The authors reported synergistic interaction between two natural non-toxic agents, honey and curcuma, against *R. mucilaginosa*. The current findings are suggestive to prepare treatment regimen from the components of these two agents for *in vivo* application in order to combat antifungal resistance.

References

- [1] Chen SC, Playford EG, Sorrell TC. Antifungal therapy in invasive fungal infections. *Curr Opin Pharmacol* 2010; **10**(5): 522–530.
- [2] Monk BC, Goffeau A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science* 2008; **321**(5887): 367–369.
- [3] Singla RK, Jaiswal N, Varadaraj BG, Jagani H. Antioxidant and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* Linn. (Arecaceae) endocarp extracts. *Indo Global J Pharm Sci* 2011; **1**(4): 354–361
- [4] Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Meslem A, Benhalima A. Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(7): 554–557.
- [5] Feás X, Estevinho ML. A Survey of the *in vitro* antifungal activity of heather (*Erica* Sp.) organic honey. *J Med Food* 2011; **14**(10) : 1284–1288.
- [6] Sakač N, Sak-Bosnar M. A rapid method for the determination of honey diastase activity. *Talanta* 2012; **93**: 135–138.
- [7] Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Bacha S, Meslem A, Khiati B. Synergistic inhibition of natural honey and potato starch and their correlation with diastase number and sugar content against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736. *Nat Prod Chem Res* 2013; **1**:

- doi: 10.4172/npcr.1000102.
- [8] Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr Res* 2002; **22**: 1041–1047.
- [9] Gheldof N, Engeseth NJ. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem* 2002; **50**(10): 3050–3055.
- [10] Kenjeric D, Mandic ML, Primorac L, Bubalo D, Perl A. Flavonoid profile of *Robinia* honeys produced in Croatia. *Food Chem* 2007; **102**: 683–690.
- [11] Kawakami K, Aketa S, Nakanami M, Iizuka S, Hirayama M. Major water-soluble polyphenols, proanthocyanidins, in leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) and their alpha-amylase inhibitory activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; **74**(7): 1380–1385.
- [12] McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase. *J Agric Food Chem* 2005; **53**(7): 2760–2766.
- [13] Amaral S, Mira L, Nogueira JM, da Silva AP, Helena Florêncio M. Plant extracts with anti-inflammatory properties—a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorg Med Chem* 2009; **17**(5): 1876–1883.
- [14] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 1999; **299**: 152–178.
- [15] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals*. Pennsylvania: NCCLS; 1999, M31–A.
- [16] Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Zerrouki K, Bourabeh A. *In vitro* synergistic antibacterial activity of natural honey combined with curcuma starch and their correlation with diastase number, flavonoid and polyphenol content. *J Plant Pathol Microb* 2013; **4**: doi: 10.4172/2157-7471.1000152.
- [17] Diekema DJ, Petroelje B, Messer SA, Hollis RJ, Pfaller MA. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(1): 476–478.
- [18] Zaas AK, Boyce M, Schell W, Lodge BA, Miller JL, Perfect JR. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(11): 5233–5235.
- [19] Moussa A, Noureddine D, Mohamed HS, Abdelmelek M, Saad A. Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Asian Pac J Trop Med* 2012; **5**(10): 773–776.
- [20] Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol* 2008; **46**(12): 3774–3779.
- [21] Kuncic MK, Jaklic D, Lapanje A, Gunde-Cimerman N. Antibacterial and antimycotic activities of Slovenian honeys. *Br J Biomed Sci* 2012; **69**(4): 154–158.
- [22] Khosravi AR, Shokri H, Katirae F, Ziglari T, Forsi M. Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. *J Apic Res* 2008; **47**(4): 256–260.
- [23] DeMera J, Angert E. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytoecographic regions of Costa Rica. *Apidologie* 2004; **35**: 411–417.
- [24] Moussa A, Noureddine D, Saad A, Abdelmelek M, Salima B. The influence of botanical origin and physicochemical parameters on the antifungal activity of Algerian honey. *J Plant Pathol Microb* 2012; **3**: doi: 10.4172/2157-7471.1000132.
- [25] Makhloufi C, Kerkvliet D, Ricciardelli d'albore G, Choukri A, Samar R. Characterization of Algerian honeys by palynological and physico-chemical methods. *Apidologie* 2010; **41**: 509–521.
- [26] Moussa A, Noureddine D, Sm H, Saad A, Bourabeh A, Houari H. Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(4): 253–255.
- [27] Gomes S, Dias LG, Moreira LL, Rodrigues P, Estevinho L. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food Chem Toxicol* 2010; **48**(2): 544–548.
- [28] Moussa A, Noureddine D, Saad A, Hebbab A, Ahmed B. Antifungal activity of a combination of Algerian honey and starch of ginger against *Aspergillus niger*. *Int J Microbiol Res* 2011; **2**(3): 263–266.
- [29] Molan PC. The antibacterial nature of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992; **73**(1): 5–28.
- [30] Chirife J, Scarmato G, Herszage L. Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. *Lancet* 1982; **1**(8271): 560–561.
- [31] Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Díaz D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F, et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol* 2010; **48**(8–9): 2490–2499.
- [32] Koc AN, Silici S, Ercal BD, Kasap F, Hörmet-Oz HT, Mavus-Buldu H. Antifungal activity of Turkish honey against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp: an *in vitro* evaluation. *Med Mycol* 2009; **47**(7): 707–712.
- [33] Moussa A, Djebli N, Aissat S, Khiati B, Ünal M, Bacha S. Antiradical activity and total phenolics of Algerian honeys and antibacterial effect against Gram-Negative Bacteria. *J Microb Biochem Technol* 2012; **4**: 152–156.
- [34] Ahmida MH, Elwerfali S, Agha A, Elagori M, Ahmida NH. Physicochemical, heavy metals and phenolic compounds analysis of Libyan honey samples collected from Benghazi during 2009–2010. *Food Nutr Sci* 2013; **4**: 33–40.
- [35] Silici S, Sagdic O, Ekici L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chem* 2010; **121**: 238–243.
- [36] Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, Chou CJ. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human alpha-amylase. *J Med Chem* 2008; **51**(12): 3555–3561.

The Relationship between Bioactive Compounds with Diastase Activity and Antibacterial Synergy of Honey and Potato Starch Combinations against *Klebsiella pneumoniae*

Moussa Ahmed*, Baghdad Khiati, Saad Aissat Nouredine Djebli, Abdelmalek Meslem and Salima Bacha

Pharmacognosy and Api-Phytotherapy Research Laboratory, Mostaganem University, Algeria

Abstract

Honey samples produced by *Apis mellifera*, both unifloral and multifloral from different sources in Algeria were examined for their antibacterial capacity and their synergism with potato starch. An agar incorporation technique was used to assess the minimum inhibition concentration (MIC) and the minimum inhibition additive concentration (MIAC) of honey against *K. pneumoniae* ATCC 27736. The physicochemical properties, α -amylases activity, total phenolic and flavonoid content, of six representative honey samples were determined. The MIC for the six varieties of honey without potato starch against *K. pneumoniae* ranged between 14% and 24% (v/v). When starch was incubated with honey and then added to media, an MIC drop was noticed with each variety and it ranged between 5.55 % and 16.66%. The total phenolic content of honey samples was between 1.50–108.21 mg GAE/100 g honey as gallic acid equivalent, total flavonoid content varied from 5.41 to 9.94 mg Catechin/kg. Mean value for diastase was 16.55 ± 2.8 (range 7.3–23.5) expressed as diastase number in Gothe's scale. No significant correlation was established between α -amylases activity and bioactive compounds. Honey: potato starch combinations show real potential for future use as a treatment for infections caused by *K. pneumoniae*.

Keywords: Algerian honey; Antibacterial activity; Potato starch; Synergism; Bioactive compounds; Diastase activity

Introduction

Klebsiella pneumoniae, an important human pathogen, is the most common cause for pneumonia, bacteremia, and septicemia, is also involved in urinary tract infections (UTI) [1]. Treatment of *K. pneumoniae* infections has become increasingly difficult because of the predominance of multiple-antibiotic-resistant strains [2,3]. Antibiotic resistance has increased substantially in recent years and is posing an ever-increasing therapeutic problem [4,5]. Honey is a natural, nontoxic, and inexpensive product for the need of novel therapies against bacterial infections. The clinical use of honey has an enormous potential, especially in the fight against antibiotic-resistant strains [5,6]. Several bioactive compounds have been identified in honey which contributed to its antibacterial action. The main factor is the high osmotic activity of honey, which does not allow bacterial growth [7]. Recent experimental finding indicated that the amylase present in honey increases the osmotic effect in the media by increasing the amount of sugars and consequently increasing the antibacterial activity [8]. Honey contains small amounts of different enzymes, notably, diastase (α - and β -amylase), invertase (α -glucosidase), glucose-oxidase, catalase and acid phosphatase, which come from nectar sources, salivary fluids and the pharyngeal gland secretions of the honeybee [9]. Diastase is a natural enzyme of honey. Alpha-amylase degrades starch to a mixture of the disaccharide maltose, the trisaccharide maltotriose and oligosaccharides known as dextrin's [10]. Also phenolic compounds may contribute to antimicrobial activity [11]. The inhibitory effects of polyphenols for α -amylases have attracted great interest among researchers [12,13]. In this study, we evaluated the antibacterial activity of 6 varieties of honey against *K. pneumoniae* and their combination with potato starch in correlation with diastase number (α -amylase), and Bioactive Compounds (total flavonoid and polyphenol content).

Materials and Methods

Honey samples

Six (n=6) commercial honeys of different floral sources and

geographical origins where purchased from local market and left at room temperature until further analysis.

Preparation of the stock starch solution

The stock starch solution was prepared by dissolving 0.5 g of dried soluble starch in deionised water in a volumetric flask. After heating and stirring the solution for approximately ten minutes, starch was completely dissolved, and the volumetric flask was filled with deionised water to the mark.

Bacterial culture and inoculum preparation

Pure culture of *K. pneumoniae* 27736 was obtained from the Department of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria. The bacteria was grown on Nutrient Agar (NA; Merck Germany) slant, incubated at 37°C for 24 h, and kept at 4°C until further use. Bacterial suspension was prepared by inoculating one loopful of the 24-h-old bacterial colonies into 10.0 ml of sterilized distilled water. The inoculum size was adjusted to match the turbidity of McFarland 0.5 scale (1×10^8 cells/ml) and diluted with sterilized distilled water to the inoculum size of 1×10^7 cells/ml.

Diastase activity (Diastase number)

Diastase activity was measured with Phadebas, according to the Harmonized Methods of the European Commission of Honey [14].

*Corresponding author: Moussa Ahmed, Pharmacognosy and Api-Phytotherapy Research Laboratory, Mostaganem University, Algeria, Tel: +213 65234059; Fax: +213 65234059; E-mail: moussa7014@yahoo.fr

Received July 22, 2013; Accepted October 17, 2013; Published October 22, 2013

Citation: Ahmed M, Khiati B, Aissat S, Djebli N, Meslem A, et al. (2013) The Relationship between Bioactive Compounds with Diastase Activity and Antibacterial Synergy of Honey and Potato Starch Combinations against *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbial 2: 131. doi: [10.4172/2327-5073.1000131](http://dx.doi.org/10.4172/2327-5073.1000131)

Copyright: © 2013 Ahmed M, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

An insoluble blue dyed cross-linked type of starch is used as the substrate. This is hydrolysed by the enzyme, yielding blue water-soluble fragments, determined photometrically at 620 nm. The absorbance of the solution is directly proportional to the diastatic activity of the sample. The diastase activity, expressed as DN or diastase number, was calculated from the absorbance measurements using Eqs. (1) and (2) for high (8–40 diastase units) and low (up to 8 diastase units) activity values, respectively:

$$DN = 28.2 \times \Delta A_{620} - 2.64(1)$$

$$DN = 35.2 \times \Delta A_{620} - 0.46(2)$$

Determination of Total Phenolic Content (TPC)

The total phenolic content (TPC) was determined by the Folin–Ciocalteu method [15]. Thirty microliters (μ l) of honey solution (0.1 g/ml) were mixed with 2.37 ml of milli Q water and 150 μ l of 0.2 N Folin–Ciocalteu reagent. The solution was thoroughly mixed by vortexing and incubated for 2 min at room temperature. Four hundred and fifty microliters (μ l) of sodium carbonate solution (0.2 g/ml) were added to the reaction mixture and further incubated for 2 h at ambient temperature. The absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer. The total phenolic content was determined by comparing with a standard curve prepared using gallic acid (0–200 mg/l). The results were mean values \pm standard deviations and expressed as milligrams of gallic acid equivalents (mg GAE)/100 g of honey

Determination of Total Flavonoid Content (TFC)

The total flavonoid content (TFC) was assessed using aluminium-chloride assay [16]. A 10 μ l volume of a 10% (v/v) honey solution was added to the wells of a 96 well plate; then 30 μ l of a 2.5% sodium nitrite, 20 μ l of 2.5% aluminium chloride solutions and then 100 μ l of a 2% sodium hydroxide solution were sequentially added. The samples were mixed well and Abs 450 nm was measured. Total flavonoid content was expressed as mg of (+)-catechin equivalents (CEQ) per kg of honey.

Antibacterial activity of honey alone

Increased concentrations (5%-50% vol/vol) were incorporated into media to test their efficiency against *K. pneumoniae* 27736. Each plate with final volume of honey and media of 5 ml was inoculated and incubated at 37°C for 24 h. The MICs was determined by finding the plates with the lowest concentration of honey on which the strain would not grow. All MIC values were expressed in % (v/v).

Antibacterial synergism of honey and potato starch toward *K.pneumoniae*

To evaluate the effect of starch on the antibacterial action of honey, 1% starch solution was prepared using sterile water. Different volumes from the stock solution were added to arrange of honey concentrations lower than the MIC. The same volume of starch solution that has given inhibition with honey was added alone to media as control to check whether or not starch alone has an inhibition effect against *K. pneumoniae*. An equivalent volume of water was added to honey instead of starch solution to confirm that additive inhibition is not due to the dilution of honey. The final volume in each plate was 5 ml. Starch content in media ranged between 1% and 8% (w/v). Honey and starch as well as honey and water were incubated for 24 h at 37°C before being incorporated into media. Plates were inoculated and incubated at 37°C for 24 bioassay was performed in duplicate and repeated twice.

Statistical analysis

Analyses are representative of 3 independent experiments, and the

data are presented as means \pm standard deviations. Correlations were established using Pearson's correlation coefficient (r) in bivariate linear correlations ($p < 0.01$). All statistical analyses were performed with the Statistica 7.0 software for Windows.

Results and Discussion

Diastase activity (Diastase number)

The major enzymes present in honey are invertase, glucose oxidase and diastase, a mixture of α -amylase and β -amylase. The honey samples analyzed in the present work show a range of values, between 22.1 and 7.3 Schade units. One sample (H5) has been shown value below 8 Schade units (Figure 5). The explanation for the low content of diastatic activity found in this one sample could be accounted for an inadequate processing or storage conditions.

Total Phenolic Content (TPC)

The amount of total phenolic content estimated using the Folin–Ciocalteu reagent in the different samples ranged from 63.93 to 95.36 mg (mg GAE/100 g honey) (Figure 4). The total phenolic content of certain honey samples has been previously determined [17,18]. For example, Dong, Zheng and Xu [19] has been reported that total phenols of in Chinese honey were 9.41 to 102.1 mg GAE/100 g. The concentration and type of polyphenolic substances depend on the floral origin of honey and are major factors responsible for biological activities, including antimicrobial activities [20].

Total Flavonoid Content (TFC)

The TFC of honey samples ranged from 5.41 to 9.94 mg CE/100 g (Figure 6) and these values are higher than that of 0.25–4.27 mg CE/100 g as reported for Brazilian honeys [21]. Flavonoid contents in Tualang honey samples studied by Khalil et al. [22] were 4.74–22.76 mg CE/100 g of honey.

Antibacterial activity of honey alone and in combination with potato starch toward *K. pneumoniae*

In the present study, it was assessed the *in vitro* antibacterial action of honey alone and in combination with potato starch against *K. pneumoniae*, determined by agar incorporation method. The determination of all the MICs and MIACs was performed in duplicate. All varieties of honey were effective against the tested strain. Without starch, the MICs of the six varieties ranged between 14% (v/v) and 24% (v/v). When starch was incubated with honey and added to media, the MIACs of the six varieties ranged between 8% (w/v) and 20% (w/v) which represents an MIC drop between 65.55% and 50% (Figures

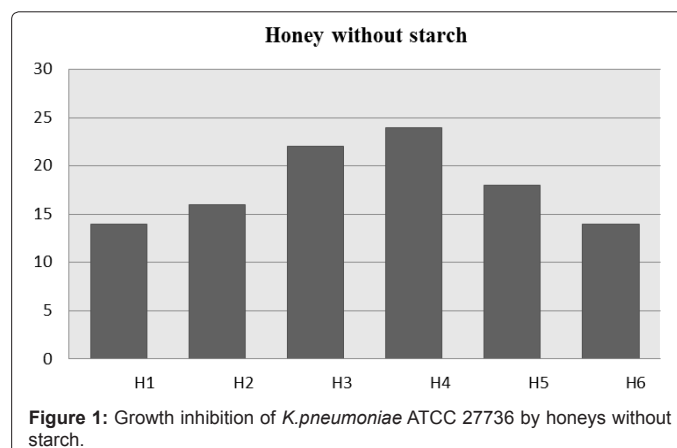
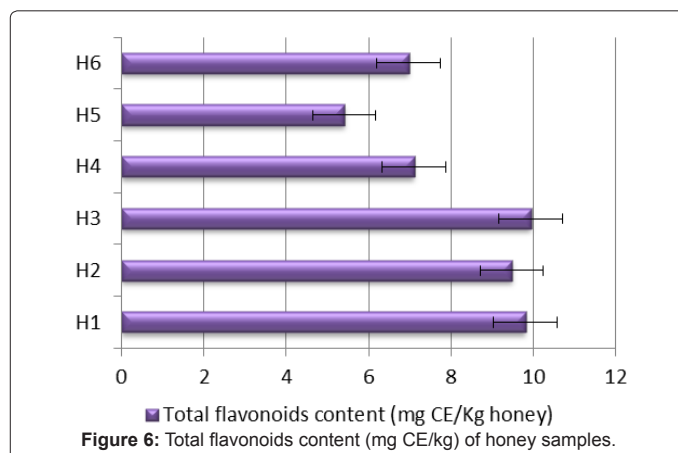
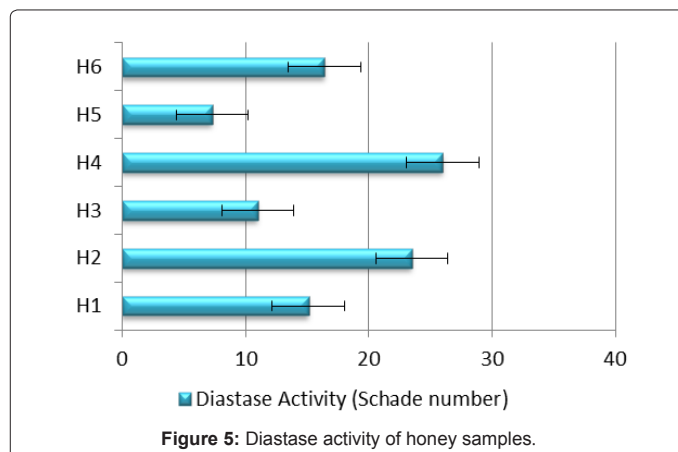
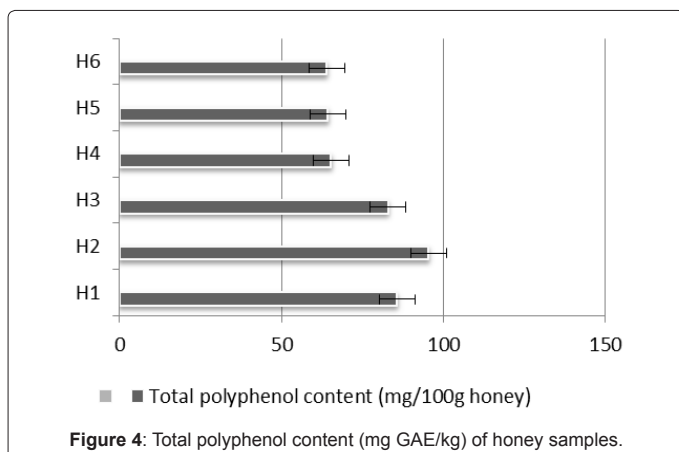
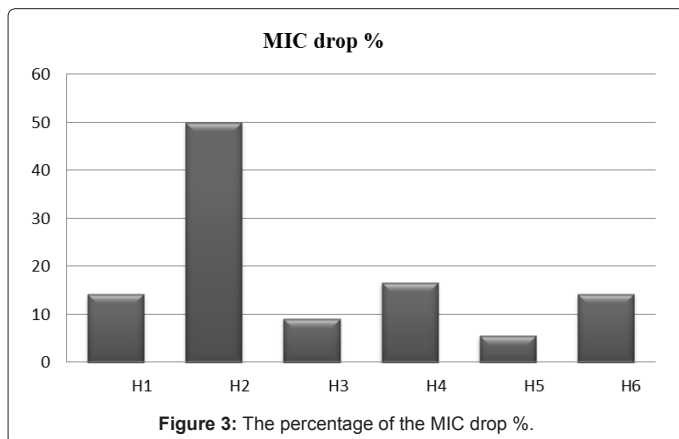
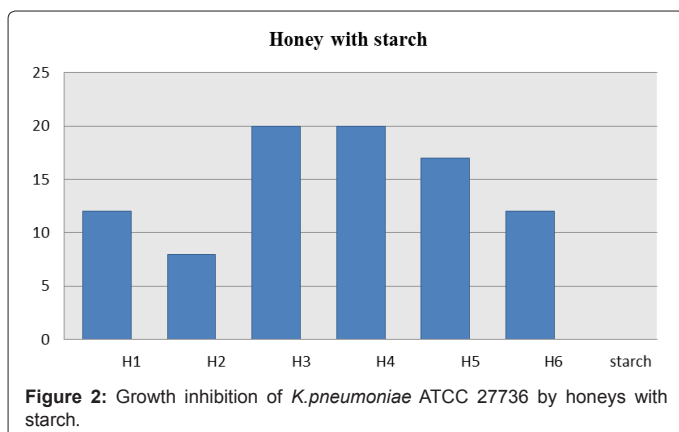


Figure 1: Growth inhibition of *K.pneumoniae* ATCC 27736 by honeys without starch.

1-3). The antimicrobial activity of honey against several pathogens and its dependence on the floral origin has been widely reported [23,24]. Several activities of honeys that contribute to their antibacterial effect are now well known. Osmolarity is an important factor in the efficacy of honey when used as an antibacterial agent for skin wounds [25]. A recent study by Ahmed et al. [26] has been demonstrated that osmosis determined the bactericidal effects of starch and honey towards *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The use of sugar for the treatment of infected wounds was investigated *in vitro* experiments with bacteria pathogenic to humans, such as *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *K. pneumoniae* [27]. Amylases present in honey were expected to split starch chains to randomly produce



dextrin and maltose and probably increase the osmotic effect in the media by increasing the amount of sugars and consequently increase the antibacterial activity [28]. The mechanism of honey antibacterial activity is complex and might be attributed to the synergistic activity between its various potent biological ingredients such as polyphenols and flavonoids [29,30]. Flavonoids are the most common polyphenols and are widely studied as α -amylase inhibitors [31]. However, in the present study, No significant correlation was established between α -amylases activity and bioactive compounds.

Conclusions

In conclusion, the results of this preliminary study highlight synergy between honey and potato starch, when used against *K. pneumoniae* which could be harnessed to improve their antibacterial capacity.

Acknowledgments

Authors thank Staff of Mostaganem University for providing material

Conflict of Interest

We declare that we have no conflict of interest.

References

- Oelschlaeger TA, Tall BD (1997) Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. Infect Immun 65: 2950-2958.
- Ariet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet P J, Lagrange P H, et al. (1994) Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4- β -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. J Clin Microbiol 32: 2553-2558.

3. Meier C, Oelschlaeger TA, Merkert H, Korhonen TK, Hacker J (1996) Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. Infect Immun 64: 2391-2399.
4. Austin DJ, Kristinsson KG, Anderson RM (1999) The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 1152-1156.
5. Mercan N, Guvensen A, Celik A, Katircioglu H (2007) Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey. Nat Prod Res 21: 187-195.
6. Kwakman PH, Van den Akker JP, Güçlü A, Aslami H, Binnekade JM, et al. (2008) Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. Clin Infect Dis 46: 1677-1682.
7. Ahmed M, Aissat S, Djebli N, Aboud B, Meslem A et al. (2011) The Influence of Starch of Ginger on the Antibacterial Activity of Honey of Different Types from Algerian against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. International Journal of Microbiological Research 3: 258-262.
8. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Douichene S (2012) The Relationship between fructose, glucose and maltose content with Diastase number and anti-Pseudomonas activity of natural honey combined with potato starch. Organic Chem Curr Res 1:6
9. Huidobro J F, Santana F J, Sanchez M P, Sancho M T, Muniategui S et al (1995) Diastase, invertase and α -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. Journal Apiculture Research 1995 34: 39-44.
10. Saka A N, Sak-Bosnar M (2012) A rapid method for the determination of honey diastase activity. Talanta 93: 135-138.
11. Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E (2008) Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. Food Chem Toxicol 46: 3774-3779.
12. Kawakami K, Aketa S, Nakanami M, Iizuka S, Hirayama M (2010) Major water-soluble polyphenols, proanthocyanidins, in leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) and their α -amylase inhibitory activity. Biosci Biotechnol Biochem 74: 1380-1385.
13. McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, et al. (2005) Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. J Agric Food Chem 53: 2760-2766.
14. Bodganov S, Martin P, Lüllmann C (1997) Harmonised methods of the European Honey Commission. Apidologie
15. Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R M (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299: 265-275.
16. Amaral S, Mira L, Nogueira JMF, Pereira da Silva A, Florencio MH. (2009) Plant extracts with anti-inflammatory properties – A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. Bioorg Med Chem 17: 1876-1883.
17. Alvarez-Suarez J M, Tulipani S, Romandini S, Vidal A, Battino M (2009) Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey: a review. Current Analytical Chemistry 5: 292-302.
18. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Khiati B, Ünal M et al (2012) Antiradical Activity and Total Phenolics of Algerian Honeys and Antibacterial Effect Against Gram-Negative Bacteria. Journal of Microbial & Biochemical Technology 4: 152-156.
19. Dong R, Zheng Y, Xu B (2011) Phenolic Profiles and Antioxidant Capacities of Chinese Unifloral Honeys from Different Botanical and Geographical Sources. Food Bioprocess Technol.
20. Al-Mamarya M, Al-Meerib A, Al-Haborib M (2002) Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. Nutrition Research 22: 1041-1047.
21. Regina L P, Sant'Ana L D, Echevarria A, Castro R N (2012) Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Brazilian Honeys and their Extracts. J. Braz. Chem. Soc 23: 618-627.
22. Khaili MI, Mahaneem M, Jamalullail SMS, Alam N, Sulaiman SA (2011) Evaluation of radical scavenging activity and colour intensity of nine Malaysian honeys of different origin. J ApiProduct ApiMedical Sci 3: 4-11.
23. Alvarez-Suarez J M, Tulipani S, Diaz D, Estevez Y, Romandini F G, et al (2010) Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with colour, polyphenol content and other chemical compounds. Food Chem Toxicol 48: 2490-2499.
24. Silici S, Sagdic O, Ekici L (2010) Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. Food Chemistry 121: 238-243.
25. Efem SE (1988) Clinical observations on the wound healing properties of honey. Br J Surg 75: 679-681.
26. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Zerrouki K, Bourabeh A (2013) In Vitro Synergistic Antibacterial Activity of Natural Honey Combined with Curcuma Starch and their Correlation with Diastase Number, Flavonoid and Polyphenol Content. Plant Pathology & Microbiology 4:1.
27. Chirife J, Herszage L, Joseph A, Kohn ES (1983) In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for the use of sugar in treating infected wounds. Antimicrob Agents Chemother 23: 766-773.
28. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Bacha S, Meslem A, et al. (2012) Synergistic Inhibition of Natural Honey and Potato Starch and their Correlation with Diastase Number and Sugar Content Against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736. Natural Products Chemistry & Research 1:1.
29. Escuredo O, Luís S, Valentão P, Sejoa M, Andrade P (2012) Assessing Rubus honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. Food Chemistry 130, 671-678.
30. Lee H, Churey JJ, Worobo RW (2008) Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. Int J Food Microbiol 126: 240-244.
31. Xiao J, Kai G, Ni X, Yang F, Chen X (2011) Interaction of natural polyphenols with α -amylase in vitro: molecular property-affinity relationship aspect. Mol Biosyst 7: 1883-1890.

Citation: Ahmed M, Khiati B, Aissat S, Djebli N, Meslem A, et al. (2013) The Relationship between Bioactive Compounds with Diastase Activity and Antibacterial Synergy of Honey and Potato Starch Combinations against *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbial 2: 131. doi: [10.4172/2327-5073.1000131](https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000131)

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 250 Open Access Journals
- 20,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: www.omicsonline.org/submit/

This article was downloaded by: [Moussa Ahmed]

On: 27 November 2013, At: 10:14

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Biologically Active Products from Nature

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/tbap20>

Antimycotic Activity of Natural Honey and their Combination with Curcuma Starch against *Candida albicans* in correlation with Flavonoid contents, Diastase activity

Moussa Ahmed^a, Baghdad Khiati^b, Abdemalek Meslem^a, Salima Bacha^a, Saad Aissat^a & Nouredine Djebli^a

^a Pharmacognosy and Api-Phytotherapy Research Laboratory, Mostaganem University, Algeria

^b Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun of Tيارت, Algeria

Published online: 25 Nov 2013.

To cite this article: Moussa Ahmed, Baghdad Khiati, Abdemalek Meslem, Salima Bacha, Saad Aissat & Nouredine Djebli (2013) Antimycotic Activity of Natural Honey and their Combination with Curcuma Starch against *Candida albicans* in correlation with Flavonoid contents, Diastase activity, *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 3:4, 259-265, DOI: [10.1080/22311866.2013.782749](https://doi.org/10.1080/22311866.2013.782749)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/22311866.2013.782749>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>



Antimycotic Activity of Natural Honey and their Combination with *Curcuma* Starch against *Candida albicans* in correlation with Flavonoid contents, Diastase activity

Moussa Ahmed ^{1*}, Baghdad Khiati ² Abdemalek Meslem ¹,
Salima Bacha ¹, Saad Aissat ¹ and Nouredine Djebli ¹

¹ Pharmacognosy and Api-Phytotherapy Research Laboratory, Mostaganem University, Algeria

² Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun of Tiaret, Algeria

Received 22 January 2013; accepted in revised form 17 March 2013

Abstract: The aim of this study was to determine the anti-*Candida albicans* activity of 6 varieties of honey and their combination with *Curcuma* starch in correlation with diastase number (α -amylase) and phenolic compounds. The quality parameters (principally, diastase number and hydroxymethyl furfural levels (HMF) of honey were investigated. The total flavonoids contents by the aluminum chloride method. An agar incorporation technique was used to assess the Minimum inhibition concentration (MICs) and Minimum additive inhibitory concentration (MAICs) of honey against *C. albicans* ATCC10231. Hydroxymethyl furfural (HMF) content shows values between 3.8 and 78.4 mg kg⁻¹ (Mean = 23.15); diastase values were between 7.3 and 26 (Mean = 16.55). The mean total flavonoid content was found to be 8.11 mg CE/kg, with a minimum of 5.41 mg CE/kg, and a maximum of 9.94 mg. The MICs for the six samples of honey without starch against *C. albicans* ranged between 40 % and 50 % (vol/vol). When starch was incubated with honey and then added to media, a MICs drop was noticed with each sample. MAICs of the six samples ranged between 32 % honey (vol/vol) with 1 % starch and 40 % honey (vol/vol) with 4 % starch. No significant correlation was established between MICs drop, diastase number and total flavonoid content. The use of curcuma starch allows honey benefit and would constitute an additive effect to the antifungal activity of honey.

Key words: Honey, *Curcuma* starch, α -amylase, phenolic compounds, *Candida albicans*.

Introduction

Candida albicans (*C. albicans*) is a leading fungal cause of burn infections in hospital settings, and sepsis is one of the principle causes of death after a severe burn. The prevalence of invasive candidiasis in burn cases varies widely, but it accounts for 3-23 % of severe infection with a mortality rate ranging from 14 to 70 %. Therefore, it is imperative that we develop innovative therapeutics to which this fungus is unlikely to evolve resistance, thus curtailing the associated morbidity and mortality and ultimately improving our capacity to treat these infections

¹. The conventional treatment of fungal disease is limited, and part of the reason is due to the limited spectrum of the currently antifungal drugs, and the expensive treatment, particularly due to the need of prolonged therapy. Thus, new drugs and alternative therapies are necessary, including natural products. Recently, honey has been attracting the attention of researchers due to its various biological activities and antifungal activity ²⁻⁶. Honey has been reported to contain about 200 substances (complex mixture of sugars, but also small amounts of other constituents such as minerals, proteins, vitamins, organic acids,

*Corresponding author (Moussa Ahmed)

E-mail: < moussa7014@yahoo.fr >

flavonoids, phenolic acids and other phytochemicals) and is considered to be an important part of traditional medicine⁷. Carbohydrates, the main constituents of honey, are produced by honey-bees from nectar sucrose, which is transformed through the action of different enzymes, notably, diastase (α - and β -amylase), invertase (α -glucosidase), glucose-oxidase, catalase and acid phosphatase, which come from nectar sources, salivary fluids and the pharyngeal gland secretions of the honeybee⁸. A diastase is any one of a group of enzymes that catalyze the breakdown of starch into maltose⁹. Alpha amylase degrades starch to a mixture of the disaccharide maltose, the trisaccharide maltotriose and oligosaccharides known as dextrans. Starch is the second most important carbon and energy source among carbohydrates, followed by cellulose in biosynthesis¹⁰.

Codex Alimentarius¹¹ proposed two quality indicators for honey, namely, 5-hydroxymethylfurfural aldehyde and amylase (diastase) activity to measure the freshness of honey. Many countries have set the national limit for HMF content in honey to 40 mg/kg.

Legislation has set a minimum level for diastase activity is expressed as the diastase number (DN) in Schade units and is defined as follows: one diastase unit corresponds to the enzyme activity of 1 g of honey, which can hydrolyse 0.01 g of starch in 1 h at 40°C. The range permitted for diastase number varies from 3 to 8 on Gothe's scale, depending on the climate prevailing in the place where the honey originates¹². The activity of this enzyme decreases with the time of storage and that of heating. Phenolic compounds are among the minor constituents in honeys, however, they greatly contribute to honey structure and biological activities. Honey polyphenolic compounds include both phenolic acids and flavonoids¹³. Alpha amylase inhibitory activity has been reported previously for various plant extracts¹⁴. Tadera *et al.*¹⁵ tested several flavonoid compounds for their inhibitory activity against α -amylase. Also Lo Piparo *et al.*,¹⁶ investigated the interactions between flavonoids and human α -amylase in order to understand the molecular requirement for enzyme inhibition.

In this study, we evaluated the anti *C. albicans*

activity of 6 varieties of honey and their combination with Curcuma starch in correlation with diastase number (α -amylase), and total flavonoid content.

Materials and methods

Sample collection

A total of 6 honey samples collected from different parts of western Algeria (Tiaret; Saïda; Relizane; and Mascara). Honey samples weighing 250 g, packed and sealed in glass bottles, were purchased from a local market, and stored at 4°C. The samples were analysed at the earliest in such a way that none of the samples exceeded the storage period beyond six months. The honey samples were kept at ambient temperature ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) overnight before the analyses were performed.

Preparation of the stock starch solution

The stock starch solution was prepared by dissolving 0.5 g of dried soluble starch in deionised water in a volumetric flask. After heating and stirring the solution for approximately ten minutes, starch was completely dissolved, and the volumetric flask was filled with deionised water to the mark.

Diastase activity (Diastase number)

Diastase activity was measured with Phadebas, according to the Harmonized Methods of the European Commission of Honey¹⁷. An insoluble blue dyed cross-linked type of starch is used as the substrate. This is hydrolysed by the enzyme, yielding blue water-soluble fragments, determined photometrically at 620 nm. The absorbance of the solution is directly proportional to the diastatic activity of the sample. The diastase activity, expressed as DN or diastase number, was calculated from the absorbance measurements using Eqs. (1) and (2) for high (8-40 diastase units) and low (up to 8 diastase units) activity values, respectively:

$$\text{DN} = 28.2 \times \Delta A_{620} \div 2.64 \quad (1)$$

$$\text{DN} = 35.2 \times \Delta A_{620} \div 0.46 \quad (2)$$

Hydroxymethylfurfural determination

5 g of honey sample is weighted and dissolved

without heating with oxygen free distilled water and transferred to a 125 ml graduated flask and made up to volume with oxygen free distilled water. The sample should be tested after preparation without delay. 2 ml of honey solution is pipette into each of two test tubes and 5 ml P-toluidine solution is added to each. Into one test tube 1 ml water is pipette and into the other 1 ml barbituric acid solution and both mixtures are shaken. The equation by which results may be roughly worked out is $\text{mg} / 1000 \text{ g HMF} = \text{absorbance} / \text{test} \times 192$. Results are expressed as mg HMF/Kg honey^{18,19}.

Estimation of total flavonoids content (TFC)

The total flavonoid content (TFC) was determined using the aluminium chloride assay according to method described by Amaral *et al.*,²⁰. A 10 μl volume of a 10 % (vol/vol) honey solution was added to the wells of a 96 well plate; then 30 μl of a 2.5 % sodium nitrite, 20 μl of 2.5 % aluminium chloride solutions and then 100 μl of a 2 % sodium hydroxide solution were added. The samples were mixed well and Abs 450 nm was measured. Total flavonoid content was expressed as mg of (+)-catechin equivalents (mg CE/kg of honey).

Antifungal activity

Culture media and inoculum standardization

C. albicans ATCC 10231, were grown on Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Merck, Germany), for 24 h at 37°C. Yeast cells from at least five colonies (1 mm diameter) were suspended in 5 mL of sterile saline solution (0.85 %), and the resulting yeast suspension was mixed for 15 s in a vortex. Then, the suspensions were adjusted by spectrophotometric method, adding saline solution, to reach the value of 0.5 in the McFarland scale corresponding to a final concentration of $3.0 \pm 2.0 \times 10^6$ cells/ mL.

Minimum Inhibitory Concentration (MICs) and Minimum additive inhibitory concentration (MAICs) determined by agar incorporation method

Increased concentrations (1 %-52 % vol/vol) were incorporated into media to test their efficiency against *C. albicans*. Each plate with

final volume of honey and media of 5 ml was inoculated and incubated at 37°C for 48 h. The MICs was determined by finding the plates with the lowest concentration of honey on which the strain would not grow. All MICs values were expressed in % (vol/vol). After determination of MICs of honey, various concentrations of honey below their MICs were prepared. Mixtures of honey and starch were prepared by mixing various concentrations of honey with various concentrations of starch. To evaluate the effect of starch on the antifungal action of honey, 1 % starch solution was prepared using sterile water. Different volumes from the stock solution were added to arrange of honey concentrations lower than the MICs. The same volume of starch solution that has given inhibition with honey was added alone to media as control to check whether or not starch alone has an inhibition effect against *C. albicans*. An equivalent volume of water was added to honey instead of starch solution to confirm that additive inhibition is not due to the dilution of honey. The final volume in each plate was 5 ml. Starch content in media ranged between 1 % and 8 % (w/vol). Honey and starch as well as honey and water were incubated for 24 h at 37°C before being incorporated into media. Plates were inoculated at 37°C for 48 h. Bioassay was performed in duplicate and repeated twice⁵.

Data analysis

Each honey was analyzed in triplicate. Results are shown as mean values and standard deviation. Correlations were established using Pearson's correlation coefficient (r) in bivariate linear correlations ($P < 0.05$). All statistical analyses were performed with the Statistica 7.0 software for Windows.

Results and discussion

Diastase is a honey natural enzyme. Its level depends upon geographic and floral origins of the product, as well as on its freshness. Table 1 represents the Diastase Number (DN) of the six varieties of honey. The DN ranged between 7. 3 and 26 which are in the interval of international standards¹⁸. One of the samples (sample 5) showed a lower level of DN 8 to limits which are indicative of temperature abuse during processing

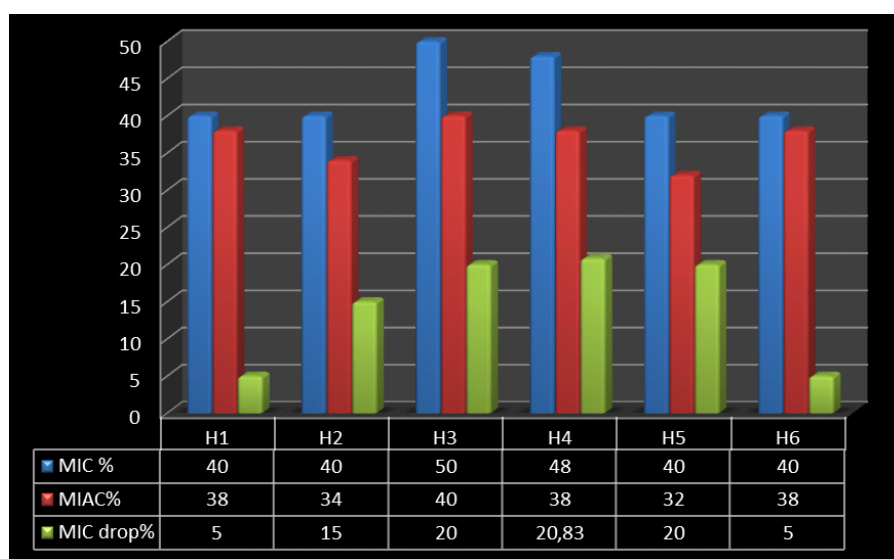
Table 1. Average values and standard deviation of the physicochemical and total flavonoid content of honey

Honey Samples	Diastase Activity	HMF (mg/kg)	Total flavonoid content (mg CE/kg of honey)
H1	15.1±2.8	78.4±1.9	9.81±0.07
H2	23.5±2.8	28.2±1.9	9.48±0.20
H3	11±2.8	11.1±1.9	9.94±0.54
H4	26±2.8	9.8±1.9	7.10±0.04
H5	7.3±2.8	7.6±1.9	5.41±0.04
H6	16.4±2.8	3.8±1.9	6.97±0.00
Mean	16.55±2.8	23.15±1.9	8.11±0.14

and / or storage practices defective. The HMF values were between 3.8 and 78.4 mg/kg (Table 1). In all samples the HMF content was found to be lower than the values recommended by the Codex Alimentarius¹⁸. (80 mg/kg). The HMF content is widely recognized as a parameter of honey samples freshness, because it is absent in fresh honeys and tends to increase during processing and/or aging of the product. Several factors influence the levels of HMF, such as temperature and time of heating, storage conditions, pH and floral source, thus it provides an indication of overheating and storage in poor conditions²¹. Total flavonoid content of six samples of honeys ranged from 5.41 to 9.94 mg

CE/Kg. The range of total flavonoid in honey obtained was coincident with that determined in multi and monofloral honey from other country. The inhibitory action was seen neither in the media containing starch only nor in media with water and starch. All samples of honey were effective against the tested strain. Without starch of curcuma, the MICs of the six varieties ranged between 40 % and 50 % (vol/vol). (Figure 1) When starch was incubated with honey and added to media, a MICs drop was noticed with each variety and the MAICs of the six varieties ranged between 32 % and 40 % (vol/vol) (Figure 1).

Six varieties of Algerian honey were used to evaluate the antifungal action against *C. albicans*.

**Figure 1. MICs and MIACs values of the six samples of honey against *C. albicans* ATCC 10231**

The MICs expressed, in percentage (vol/vol), for four varieties of honey without starch against *C. albicans* were 38 % and 42 %, respectively. For *Aspergillus niger*, the MICs without starch were 53 % and 57 %, respectively. When starch was incubated with honey and then added to media, the MICs for *C. albicans* were 32 % and 36 %, respectively, with a starch concentration of 4 and 2 %, whereas the MICs for *A. niger* were 49 % and 51 %, with starch concentrations of 2 % and 4 %, respectively^{5,22}. Honey is a natural product made by honey-bees. This natural product is considered a part of traditional medicine (treatment of burns, gastrointestinal disorders, asthma, skin ulcers, and cataracts)^{23, 24}. Honey may inhibit yeast growth for several different reasons. High sugar concentration, low pH, hydrogen peroxide generation, flavonoid extract, proteinaceous compounds, these factors have various toxic effects on microorganisms that directly affect their metabolism and structure^{25,26}.

In Algeria, there are few types of alternative medicine such as honey. Recent experimental finding indicated that the amylase present in honey increases the osmotic effect in the media by increasing the amount of sugars and consequently increasing the antifungal activity^{5,22}. Molan²⁷ has studied sugar syrups of the same water activity as honey and found them to be less

effective than honey at inhibiting microbial growth *in vitro*.

Truchado *et al.*²⁸ found an antibacterial water-soluble antibacterial factor probably belonging to the carbohydrate fraction. Amylase present in honey was expected to split starch chains into randomly produced dextrin and maltose and probably increases the osmotic effect in the media by increasing the amount of sugar and consequently increases the antifungal activity. Adding starch to honey has shown a significant decrease in the MICs for the six varieties of honey against the tested strain. The inhibitory action was seen neither in the media containing starch only nor in media with honey and water with the corresponding MICs.

No significant correlation was established between MICs drop, diastase number and total flavonoid contents. Neither honey nor starch has adverse effects on tissues, so they can be safely used in wounds, burns and inserted in cavities and sinuses to clear infection. The results will enable a systematic study of many varieties of honey on pathogenic yeasts with increased resistance opposite conventional antifungal.

Acknowledgements

Authors are thankful to staff of Mostaganem University for providing material.

References

1. Macherla, C., Sanchez, D.A., Ahmadi, M.S., Vellozzi, E.M., Friedman, A.J., Nosanchuk, J.D., Martinez, L.R. (2012). Nitric oxide releasing nanoparticles for treatment of *Candida albicans* burn infections. *Front Microbiol.* 3: 193.
2. Ahmed, M., Djebli, N., Aissat, S., Meslem, A., Bacha, S. (2012). The Influence of Botanical Origin and Physicochemical Parameters on the Antifungal Activity of Algerian Honey. *J. Plant Pathol. Microb.*, 3:5dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000132.
3. Ahmed, M., Djebli, N., Aissat, S., Meslem, A. (2012). Anti-*Aspergillus niger* of eucalyptus honey influenced by thermal treatment. *Scientific Reports.* 1:2. <http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports.175>.
4. Ahmed, M., Djebli, N., Aissat, S., Meslem, A., Benhalima, A. (2012). Antifungal Activity of Four Honeys of Different Types From Algeria Against Pathogenic Yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. (2: 7) 554-557. dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60096-3
5. Ahmed, M., Djebli, N., Hammoudi, S.M., Aissat, S., Akila, B., Hemida, H. (2012). Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. 253-255. dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60018-5
6. AL-Waili, N. (2001). Therapeutic and prophylactic effects of crude honey on chronic seborrheic dermatitis and dandruff. *Eur. J. Med. Res.*, 6: 306-308.

7. **White, J.W. (1979).** Composition of honey. In E. Crane (Ed.), *Honey: A comprehensive survey* (pp. 157-158). London: Heinemann.
8. **Huidobro, J.F., Santana, F.J., Sanchez, M.P., Sancho, M.T., Muniategui, S., Simal-Lozano, J. (1995).** Diastase, invertase and b-glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain *J. Api. Res.* 34 (1995) 39-44.
9. **Crane, E. (1975).** *Honey: A Comprehensive Survey*. International Bee Research Association, Heinemann, London, UK
10. **Buchholz, K. and Seibel, J. (2008).** Industrial carbohydrate biotransformation. *Carbohydrate Research*, 343: 1966-1979.
11. **Codex Alimentarius Commission. (2001).** Revised codex standard for honey. Codex Standard 12-1981. Rome: FAO and WHO.
12. **Bogdanov, S. (2002).** Harmonised Methods of the International Honey Commission. International Honey Commission: 1-62.
13. **Tomas-Barberan, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S. and Anklam, E. (2001).** "HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys". *J. Sci. Food Agric.* 81 (5) 485-496.
14. **Ingrid, F., Matthias, F. (2006).** Traditionally used plants in diabetic therapy-phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Brazil J. Pharmacog.* 16(1): 1-5.
15. **Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T. (2006).** Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoid s. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52, 149-153.
16. **Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., Chou, C.J. (2008).** Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human α -Amylase. *J. Med. Chem.*, 51: 3555-3561.
17. **Bogdanov, S., Martin, P. and Lüllmann, C. (1997).** Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, 1-59.
18. **Winkler, C. (1955).** Beitrag Zur Nachweis und Zur Bestimmung Von Kunsthoning. *Zeitschr. Lebensm. Unters. Forsch* 102: 161-167.
19. **Auerbach, F., Borries, G. (1924).** Auerbach and Borries equation. *Z Nahr Genssm*22: 353-358.
20. **Amaral, S., Mira, L., Nogueira, J.M.F., Pereira da Silva, A. and Florêncio, M.H. (2009).** Plant extracts with anti-inflammatory properties – A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17: 1876-1883.
21. **Fallico, B., Arena, E., Verzera, A., Zappala, M. (2006).** The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accreditation and Quality Assurance* 11, 49-54.
22. **Ahmed, M., Djebli, N., Aissat, S., Aggad, H. and Ahmed, B. (2011).** Antifungal Activity of a Combination of Algeria Honey and Starch of Ginger Against *Aspergillus niger*. *I J M R* 2(3): 263-266.
23. **Al, L.M., Daniel, D., Moise, D., Bobis, O., Laslo, L. and Bogdanov, S. (2009).** Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chem*, 112: 863-867.
24. **Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M. and Estevinho, L.M. (2009).** Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem*, 114: 1438-1443.
25. **Candiracci, M., Citterio, B., Piatti, E. (2012).** Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chemistry*. 131: 493-499.
26. **Al-Waili, N.S., Salom, K., Butler, G.A.I., Ghamdi, A.A. (2011).** Honey and Microbial Infections: A Review Supporting the Use of Honey for Microbial Control. *J. Med. Food* 14(10): 1079-1096.

-
27. **Molan, P.C. (2001).** Honey as a topical antibacterial agent for treatment of infected wounds. *American J. Clinical Dermatology*, 2: 13-19.
 28. **Truchado, P., Lopez-Galvez, F., Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Allende, A. (2009).** Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem.*, 115: 1337-1344

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.



ISSN:2157-7471

Journal of Plant Pathology & Microbiology

**The International Open Access
Journal of Plant Pathology & Microbiology**

Executive Editors

Chandradhar Dwivedi
South Dakota State University, USA

Rodrigo A. Valverde
Louisiana State University, USA

Leland Stanley Pierson III
University of Arizona, USA

C.O. Thoen
Iowa State University, USA

Guangming Zhong
University of Texas, USA

Available online at: OMICS Publishing Group (www.omicsonline.org)

This article was originally published in a journal by OMICS Publishing Group, and the attached copy is provided by OMICS Publishing Group for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for commercial/research/educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are requested to cite properly.

Digital Object Identifier: <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000152>

In Vitro Synergistic Antibacterial Activity of Natural Honey Combined with Curcuma Starch and their Correlation with Diastase Number, Flavonoid and Polyphenol Content

Moussa Ahmed^{1*}, Nouredine Djebli², Saad Aissat¹, Kheira Zerrouki³ and Akila Bourabeh¹

¹Institute of Veterinary Sciences University, Ibn-khaldoun Tiaret (14000), Algeria

²Departments of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria

³Departments of Biology, Chlef University, Algeria

Abstract

Honey has been acknowledged worldwide as a good source of natural carbohydrates and sweetener. Six honey samples of *Apis mellifera* forged on plants from western Algeria were analyzed to determine Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), Diastase Number (DN), Hydroxy Methyl Furfural (HMF) content and antibacterial activity alone and in combination with Curcuma Starch. The total phenol content was determined by using the Folin-Ciocalteu method, and the flavonoid content was analyzed using by the aluminum chloride method. The HMF and DN were determined by harmonized methods. An agar incorporation technique was used to assess the Minimum Inhibition Concentration (MICs) and Minimum Inhibition Additive Concentration (MIACs) of honey against two strains of Gram-Negative bacteria (*Escherchia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2154). Total phenolic content of honeys ranged from 63.93 to 95.36 mg GAE/100 g honey, while Total Flavonoid Content (TFC) ranged from 5.41 to 9.94 mg CE/100 g. Hydroxy Methyl Furfural (HMF) content shows values between 3.8 and 78.4 mg kg⁻¹; diastase values were between 7.3 and 26. The MAIC for the six varieties of honeys tested ranged between 12 and 18% (vol/vol) and 11 and 15% (vol/vol) against *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively. The MIC range for honey alone was 5-70% (vol/vol) and 5-40 % (vol/vol) against *E. coli* and *S. aureus*, respectively. A positive correlation was observed between total phenolic content and diastase activity ($r=0.248$) and between diastase activity and total flavonoid content ($r=0.240$). No clear correlation has been established between the MIC drop and the Diastase Number. The use of curcuma starch allows honey benefit and would constitute a synergetic effect to the antibacterial activity of honey.

Introduction

Microbial infections are the cause of a large burden of diseases and bacteria are listed in the first position among the common microorganisms responsible for opportunistic diseases occurring associated with AIDS. Therapy of bacterial infections is a frequent problem due to the emergence of bacterial strains resistant to numerous antibiotics [1,2]. These shortcomings lead to an urgent global call for new antibacterial drugs, particularly from natural resources. Honey is a natural product, well known for thousands of years for its high nutritive value and healing properties. Also Honey has been considered as an important part of traditional medicines since ancient times [3]. Its functions in the treatments of burns, gastrointestinal disorders, asthma, infections, and skin ulcers [4,5]. Honey has an established function as an antibacterial agent that has a broad spectrum of activity against gram-positive and gram negative bacteria [6-8]. More recently maillard reaction products was discovered to contribute to the activity of Canadian honeys [9], bee defensin-1 was detected in a Dutch honey [10] catalase to hydrogen peroxide ratio [11], antibiotic peptides [12], methylglyoxal [13] and melanoidins [9]. Phenolic acids and flavonoids in honey have also been found to inhibit the growth of a wide range of Gram-negative and Gram-positive bacteria [14,15]. Honey is a supersaturated solution of sugars, of which fructose (38%) and glucose (31%) are the main contributors, with phenolic compounds, minerals, proteins, free amino acids and vitamins acting as minor components [16]. Also honey contains small amounts of different enzymes, notably, diastase (α - and β -amylase), invertase (α -glucosidase), glucose-oxidase, catalase and acid phosphatase, which come from nectar sources, salivary fluids and the pharyngeal gland secretions of the honeybee [17]. A diastase is any one of a group of enzymes that catalyze the breakdown of starch into maltose [18]. Alpha amylase degrades starch to a mixture of the disaccharide maltose, the trisaccharide maltotriose

and oligosaccharides known as dextrans. Diastase activity is expressed as the Diastase Number (DN) in Schade units and is defined as follows: one diastase unit corresponds to the enzyme activity of 1 g of honey, which can hydrolyse 0.01 g of starch in 1 h at 40°C [19], the activity of this enzyme decreases with the time of storage and that of heating. Alpha amylase inhibitory activity has been reported previously for various plant extracts [20]. The inhibitory effects of polyphenols for α -amylases have attracted great interest among researchers [21-26]. Tadera et al. [27] tested several flavonoids compounds for their inhibitory activity against α -amylase. Also Lo Piparo et al. [28] investigated the interactions between flavonoids and human α -amylase in order to understand the molecular requirement for enzyme inhibition. The antimicrobial properties of Algerian honey available on the market differ on account of various factors like geographical and botanical source [29,30]. In this study, we evaluated the antibacterial activity of honey combined with curcuma starch and their correlation with diastase number, flavonoid and polyphenol content.

*Corresponding author: Moussa Ahmed, Institute of Veterinary Sciences University, Ibn-khaldoun Tiaret (14000), Algeria, Tel: +213 65234059; E-mail: moussa7014@yahoo.fr

Received November 24, 2012; Accepted December 27, 2012; Published January 01, 2013

Citation: Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Zerrouki K, Bourabeh A (2013) In Vitro Synergistic Antibacterial Activity of Natural Honey Combined with Curcuma Starch and their Correlation with Diastase Number, Flavonoid and Polyphenol Content. J Plant Pathol Microb 4:152. doi:10.4172/2157-7471.1000152

Copyright: © 2013 Ahmed M, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Materials and Methods

Honey samples

A total of 6 honey samples were collected from various botanical and geographical sources in Algeria were collected from bee keepers and obtained from local markets. All samples were transferred to the laboratory, stored in amber flasks, and kept at 4°-5°C until analysis.

Preparation of the stock starch solution

The stock starch solution was prepared by dissolving 0.5 g of dried soluble starch in deionised water in a volumetric flask. After heating and stirring the solution for approximately ten minutes, starch was completely dissolved, and the volumetric flask was filled with deionised water to the mark.

Diastase activity (Diastase number)

The determination of Diastase activity or Diastase Number (DN) was carried out according to Phadebas method recommended by Harmonized methods of the International Honey Commission [31]. An insoluble blue dyed cross-linked type of starch is used as the substrate. This is hydrolyzed by the enzyme, yielding blue water-soluble fragments, determined photometrically at 620 nm. The absorbance of the solution is directly proportional to the diastatic activity of the sample. The diastase activity, expressed as DN or diastase number, was calculated from the absorbance measurements using Eqs. (1) and (2) for high (8-40 diastase units) and low (up to 8 diastase units) activity values, respectively:

$$DN=28.2 \times \Delta A_{620} - 2.64 \quad (1)$$

$$DN=35.2 \times \Delta A_{620} - 0.46 \quad (2)$$

Hydroxymethylfurfural (HMF)

Hydroxymethylfurfural (HMF) was detected using a technique based on the method described by Winkler [32]. Five grams of honey were dissolved, without heating, in oxygen free distilled water and transferred to a 125 ml graduated flask and diluted to volume with oxygen free distilled water. Two milliliters of honey solution was pipetted into two tubes and 5 ml of P-toluidine solution was added to each. Into one test tube, 1 ml of water was pipetted and into the other 1 ml of barbituric acid solution was added; both mixtures were then shaken. Absorbance was read using a spectrophotometer against a blank at a wave length of 550 nm. Calculation: mg/100 g

$$\text{hydroxymethylfurfural} = \text{absorbance}/\text{test} \times 192 \quad [33].$$

Determination of total phenolic content

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu (F-C) method [34]. 30 ml of honey solution (0.1 g/ml) was mixed with 2.37 ml of milli Q water and 150 µl of 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent. The solution was thoroughly mixed by vortexing and incubated for 2 min at ambient temperature. 450 ml of sodium carbonate solution (0.2 g/ml) was added to the reaction mixture and further incubated for 2 h at ambient temperature. The absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer. The total phenolic content was determined by comparing with a standard curve prepared using gallic acid (0-200 mg/l). The mean of at least three readings was calculated and expressed as mg of gallic acid equivalents (mg GAE)/100 g of honey.

Total flavonoid content

The Total Flavonoid Content (TFC) was determined using the aluminium chloride assay according to Amaral et al. [35]. A 10 µl

volume of a 10% (v/v) honey solution was added to the wells of a 96 well plate; then 30 µl of a 2.5% sodium nitrite, 20 µl of 2.5% aluminium chloride solutions and then 100 µl of a 2% sodium hydroxide solution were sequentially added. The samples were mixed well and Abs 450 nm was measured. TFC was expressed as mg catechin equivalents (CE)/100 g.

Determination of antibacterial activity

Bacterial stains: Two Gram-negative *Escherchia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC2154). All the strains were cultured at 37°C on nutrient agar (NA; Merck, Germany) medium, and the Mueller-Hinton broth medium (MHB; Merck, Germany) has been used in the antibacterial activity assay. All the test microorganisms were purchased from the American Type Culture Collection. The cultures of bacteria were maintained in their appropriate agar slants at 4°C throughout the study and used as stock cultures.

Preparation of standard inoculums: Fresh microbial cultures were prepared by streaking loopful of bacterial suspension into organism specific selective media (Merck, Germany) and incubated at optimal temperature in order to maintain approximately uniform growth rate of each organism. The bacterial cultures from fresh media were compared with 0.5 McFarland turbidity standards, which is equivalent to approximately 1×10^8 bacterial cell counts per ml and it was maintained throughout the experimentation.

MIC and MIAC determinations

Minimum inhibitory concentration (MIC): Increased concentrations (1%-50% vol/vol) were incorporated in to media to test their efficiency against *P. aeruginosa* and *E. coli*. Each plate with final volume of honey and media of 5 ml was inoculated and incubated at 37°C for 48 h. The MIC was determined by finding the plates with the lowest concentration of honey on which the strain would not grow. All MIC values were expressed in % (vol/vol).

Minimum additive inhibitory concentration (MAIC): To evaluate the effect of starch on the antifungal action of honey, 1% starch solution was prepared using sterile water. Different volumes from the stock solution were added to arrange of honey concentrations lower than the MIC. The same volume of starch solution that has given inhibition with honey was added alone to media as control to check whether or not starch alone has an inhibition effect against *P. aeruginosa* and *E. coli*. An equivalent volume of water was added to honey instead of starch solution to confirm that additive inhibition is not due to the dilution of honey. The final volume in each plate was 5 ml. Starch content in media ranged between 1% and 8% (wt/vol). Honey and starch as well as honey and water were incubated for 24 h at 37°C before being incorporated into media. Plates were inoculated and incubated at 37°C for 24 h bioassay was performed in duplicate and repeated twice.

Statistical analysis

Analyses were made in triplicate, and the data are presented as mean \pm standard deviation. Correlations were established using Pearson's correlation coefficient (*r*) in bivariate linear correlations ($p < 0.01$). All statistical analyses were performed with the Statistica 7.0 software for Windows.

Results and Discussion

Diastase activity and HMF are widely recognized as parameters for the evaluation of honey freshness and/or overheating. International regulations set a minimum value of 8 on Gothe's scale for diastase

activity, and a maximum HMF content of 40 mg kg⁻¹. The mean of HMF was found 31.2 mg/kg with the range of 7.68 to 52.6 mg/kg (Table 1). One of the samples (H1) showed levels of HMF higher than the allowed limits of 40 mg/kg, which are indicative of temperature abuse during processing and/or bad storage practices. Several factors influence HMF levels, such as temperature and time of heating, storage conditions, pH and floral source, so it provides an indication of overheating and storage in poor conditions [36]. The mean of diastase activity was 9.80 in all samples (Table 1). The variation in the activity of diastases and HMF may be related to source of honey as well as climate of region [37]. Polyphenols are an important group of compounds which influence the appearance and the functional properties of honey [38]. The total phenolic content (mg GAE/100 g of honey) of Algerian honeys was found in the range of 63.93 to 95.36 (Table 1) which was determined using gallic acid as standard (R²=0.9988). A similar level of phenolic content was also observed for Romanian honeydew honeys for which the phenolic content varied from 23.0 to 125.0 mg GAE/100 g [39]. The concentration of polyphenols varies in honeys of different botanical origin and ranges from 46.0 to 456 mg/j/kg [40] and is major factors responsible for biological activities, including antioxidant, antimicrobial, antiviral and anticancer activities [41]. The TFC of honey samples ranged from 5.41 to 9.94 mg CE/100 g and these values are higher than that of 0.25-8.38mg CE/100 g as reported for Brazilian honeys [42]. Flavonoid contents in Burkina Faso honey samples studied by Meda et al. [43] were 0.17-8.35 mg CE/100 g of honey. In samples from Chile, flavonoid content ranged from 0.014 to 13.8 mg CE/100 g of honey [44]. In the analysis of Algerian honey samples, a low correlation (r=0.878) (Table 3) between the total flavonoid and total phenolic contents was observed. Islam et al. [42] also described a low correlation (r=0.959) between the total amount of flavonoids and the total amount of phenolic compounds.

The antibacterial properties of honey have been reviewed

	Phenolics (mg Gallic acid/kg)		Flavonoids (mg Catechin/kg)		Diastase Number (Schade Number*)		HMF (mg/kg)	
	Mean	DS	Mean	DS	Mean	DS	Mean	DS
	H1	85.62	2.75	9.81	0.07	15.1	2.8	78.4
H2	95.36	6.08	9.48	0.20	23.5	2.8	28.2	1.9
H3	82.85	14.24	9.94	0.54	11	2.8	11.1	1.9
H4	65.31	1.60	7.10	0.04	26	2.8	9.8	1.9
H5	64.29	1.55	5.41	0.04	7.3	2.8	7.6	1.9
H6	63.93	0.11	6.97	0.00	16.4	2.8	3.8	1.9

*Schade number corresponds to Gothe number or 0.01 g starch hydrolysed 1h at 40°C per 1 g honey.

HMF: Hydroxymethylfurfural.

Table 1: Total polyphenol content (TP), total flavonoids content (TFC), diastase Number and HMF results represent the average of four measurements ± SD (n=3).

Honey samples	Honey only		Curcuma starch and honey			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 2154	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 2154	
	MICs % (vol/vol)	MICs % (vol/vol)	MIACs % (vol/vol)	MIC drop%	MIACs % (vol/vol)	MIC drop%
H1	16	12	12	25	11	8.33
H2	14	12	12	14.28	11	8.33
H3	20	16	18	10	15	6.25
H4	16	14	14	12.5	13	7.14
H5	16	12	14	12.5	11	8.33
H6	10	12	09	10	11	8.33

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum additive inhibitory concentration (MAIC) and minimum inhibitory concentration drop (MIC drop) of tested honeys.

	Phenolics	Flavonoids	Diastase Number	HMF
Phenolics	1.000	0.878*	0.248*	0.577*
Flavonoids	0.878*	1.000	0.240*	0.585*
Diastase Number	0.248*	0.240*	1.000	0.137
HMF	0.577*	0.585*	0.137	1.000

(*) Significant P values (P<0.01)

Table 3: Correlation showing the interrelation among phenolics, flavonoids, diastase number and HMF.

	Phenolics	Flavonoids	Diastase Number	HMF
MIC drop <i>E. coli</i> ATCC 25922	0.437*	0.414*	0.042	0.978*
MIC drop <i>P. aeruginosa</i> ATCC 2154	-0.013	-0.308*	0.009	0.325*

(*) Significant P values (P<0.01)

Table 4: Pearson's correlation coefficients obtained when correlations between MIC drop honey and different characteristics of honey were studied.

extensively during the last years in multiple studies all over the world. The results of our work indicated that the six varieties of honeys tested have an antibacterial property. The intensity of effect on the growth of germs, varied according to the botanical honey origin and the type of germ tested. As a whole, the six varieties presented antibacterial activities against *E. coli* at concentrations from 14 to 20% (vol/vol) and 12 to 16% (vol/vol) for *P. aeruginosa* (Table 2). When starch was incubated with honey and added to media, a MIC drop was noticed with each variety and the MAICs of the six varieties ranged between 11 to 15% and 9 to 18% (vol/vol) (Table 2). The inhibitory action was seen neither in the media containing starch only nor in media with water and starch. Infection with *P. aeruginosa* is the most serious complication in burns patients [45,46], followed by infections with *E. coli* and other pathogen microorganisms [45]. With increasing interest in the use of alternative therapies and as the development of antibiotic resistant bacteria spreads. Many works was interested, during this last decade, with the products of the hive and in particular honey, efficient product against the germs secreted by the bees as a possible source of new pharmaceutical and medical agent. Honey saturated or super-saturated sugar, containing about 95% sugars [47]. Such a high concentration of sugar has antimicrobial activity since it cause osmotic stress [48, 49]. The high osmolarity of honey is due to the high content of sugar (average over 85% of honey) including fructose, glucose, maltose, sucrose and other types of carbohydrates [50]. Sugar paste was reported as being used successfully in 605 patients with wounds, burns and ulcers, with lower requirements for skin grafting, antibiotics, and lower hospital costs [51]. Recent experimental finding indicated that the ginger and potato starch and amylase present in honey increases the osmotic effect in the media by increasing the amount of sugars and consequently increasing the antimicrobial activity [52-55]. In recent years, a large number of studies have been done on the antibacterial activity of phenolic compounds of natural origin. Phenolics compounds of honey have been shown to exhibit antibacterial activities [16, 56-58]. Davidson et al. [59] have shown that individual phenolic compounds have growth inhibition on a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. But Ulusoy et al. [60] found that antimicrobial activity was not linearly correlated with total and individual phenolic compounds. In the present study, the relationship between phenolic, Flavonoids content, HMF and the MIC drop of honey was observed (Table 4). No correlation has been established between the MIC drop and the Diastase Number.

Honey is one of the natural products widely used to treat infections

that resist conventional drugs. But its price makes it an unaffordable substance in developing countries. Our results show that adding starch to honey could contribute to reducing the quantity of honey to be used without losing the expected effect. In the present study, the antibacterial activity of honey on *E. coli* and *P. aeruginosa* strains were confirmed and synergism was possible with curcuma starch tested. These data encourage further *in vivo* studies to validate these interesting results before clinical trials can proceed.

References

1. Keasah C, Odugbmi T, Ben Redjeb S, Boye CS, Dosso M (1998) The Members of Palm Project. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Eight African Hospitals and Malta. Poster E.093, 38th ICAAC, San Diego, USA.
2. Otsuki M, Nishino T (2000) Report of questionnaire survey for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the Kinki district. *Kansenshogaku Zasshi* 74: 658-663.
3. White JW Jr (1979) Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural, and proline in honey: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 62: 515-526.
4. Orhan F, Sekerel BE, Kocabas CN, Sackesen C, Adalioglu G, et al. (2003) Complementary and alternative medicine in children with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 90: 611-615.
5. Silva LR, Videira R, Monteiro AP, Valentao P, Andrade PB (2009) Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchem J* 93: 73-77.
6. Moussa A, Nouredine D, Mohamed HS, Abdelmelek M, Saad A (2012) Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Asian Pac J Trop Med* 5: 773-776.
7. Moussa A, Nouredine D, Abdelmelek M, Saad A (2012) Antibacterial activity of various honey types of Algeria against pathogenic gram-negative bacilli: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2: 211-214.
8. Lusby PE, Coombes A, Wilkinson JM (2002) Honey: a potent agent for wound healing? *J Wound Ostomy Continence Nurs* 29: 295-300.
9. Brudzynski K, Miotto D (2011) Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chem* 127: 1023-1030.
10. Kwakman PH, de Velde AA, de Boer L, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. (2010) How honey kills bacteria. *FASEB J* 24: 2576-2582.
11. Weston RJ (2000) The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chem* 71: 235-239.
12. Kwakman PHS, de Boer L, Ruyter-Spira CP, Creemers-Molenaar T, Helsper JP, et al. (2011) Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptide has enhanced activity against antibiotic resistant pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 251-257.
13. Adams JC, Boulton CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MN, et al. (2008) Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 343: 651-659.
14. Davidson PM (1993) Parabens and phenolic compounds-Antimicrobials in Foods. (2nd edn), Marcel Dekker, New York.
15. Taormina PJ, Niemira BA, Beuchat LR (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int J Food Microbiol* 69: 217-225.
16. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Diaz D, Estevez Y, Romandini S, et al. (2010) Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol* 48: 2490-2499.
17. Huidobro JF, Santana FJ, Sanchez MP, Sancho MT, Muniategui S, et al. (1995) Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. *J Api Res* 34: 39-44.
18. Crane E (1975) Honey: A Comprehensive Survey, International Bee Research Association, Heinemann, London, UK.
19. Sakáč N, Sak-Bosnar M (2012) A rapid method for the determination of honey diastase activity. *Talanta* 93: 135-138.
20. Sai Kumar RS, Singh SA, Rao AG (2009) Conformational stability of alpha-amylase from malted sorghum (*Sorghum bicolor*): reversible unfolding by denaturants. *Biochimie* 91: 548-557.
21. Kawakami K, Aketa S, Nakanami M, Iizuka S, Hirayama M, et al. (2010) Major water-soluble polyphenols, proanthocyanidins, in leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) and their alpha-amylase inhibitory activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 1380-1385.
22. Shobana S, Sreerama YN, Malleshi NG (2009) Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chem* 115: 1268-1273.
23. Lee YA, Cho EJ, Tanaka T, Yokozawa T (2007) Inhibitory activities of proanthocyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzymes related to diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol* 53: 287-292.
24. Xiao J, Kai G, Ni X, Yang F, Chen X (2011) Interaction of natural polyphenols with α -amylase *in vitro*: molecular property-affinity relationship aspect. *Mol Biosyst* 7: 1883-1890.
25. McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, et al. (2005) Different Polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase. *J Agric Food Chem* 53: 2760-2766.
26. Grussu D, Stewart D, McDougall GJ (2011) Berry polyphenols inhibit α -amylase *in vitro*: identifying active components in rowanberry and raspberry. *J Agric Food Chem* 59: 2324-2331.
27. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T (2006) Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol* 52: 149-153.
28. Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, et al. (2008) Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human alpha-amylase. *J Med Chem* 51: 3555-3561.
29. Ahmed Moussa, Djebli Nouredine, Aissat Saad, Meslem Abdelmalek, Bacha Salima (2012) The Influence of Botanical Origin and Physicochemical Parameters on the Antifungal Activity of Algerian Honey. *J Plant Pathol Microb* 3: 5.
30. Moussa A, Nouredine D, Saad A, Abdelmelek M, Abdelkader B (2012) Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pac J Trop Biomed* 2: 554-557.
31. Bogdanov S (2002) Harmonised methods of the international honey commission. Swiss Bee Research Center, Switzerland 1-62.
32. Winkler C (1955) Beitrag Zur Nachweis und Zur Bestimmung Von Kunsthoning. *Zeitschr Lebensm Unters Forsch* 102: 161-167.
33. Auerbach F, Borries G (1924) Auerbach and Borries equation. *Z Nahr Genssm* 22: 353-358.
34. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
35. Amaral S, Mira L, Nogueira JM, da Silva AP, Helena Florêncio M (2009) Plant extracts with anti-inflammatory properties-A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorg Med Chem* 17: 1876-1883.
36. Fallico B, Arena E, Verzera A, Zappalà M (2006) The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accreditation and Quality Assurance* 11: 49-54.
37. Singh N, Bath PK (1997) Quality evaluation of different types of Indian honey. *Food Chem* 58: 129-133.
38. Cimpoiuc C, Hosu A, Miclaus V, Puscas A (2012) Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 100: 149-154.
39. Al ML, Daniel D, Moise A, Bobis O, Laslo L, et al. (2009) Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chem* 112: 863-867.
40. Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ (2002) Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *J Agric Food Chem* 50: 5870-5877.

41. Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M (2002) Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. Nutr Res 22: 1041–1047.
42. Islam A, Khalil I, Islam N, Moniruzzaman M, Mottalib A, et al. (2012) Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. BMC Complementary and Alternative Medicine 12: 177.
43. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chem 91: 571–577.
44. Muñoz O, Copaja S, Speisky H, Peña R, Montenegro G (2007) Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. Quim. Nova 30: 848-851.
45. Nasser S, Mabrouk A, Maher A (2003) Colonization of burn wounds in Ain Shams University burn unit. Burns 29: 229-233.
46. Altöparlak U, Aktas F, Selebi D, Özkurt Z, Akcay MN (2005) Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Actinobacter baumannii* isolated from burn wounds and *in vitro* activities of antibiotic combinations against these isolates. Burns 31: 707-710.
47. Wang J, Li QX (2011) Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins. Adv Food Nutr Res 62: 89-137.
48. Chirife J, Scarmato G, Herszage L (1982) Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. Lancet 1: 560-561.
49. Molan PC (1992) The antibacterial nature of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World 73: 5-28.
50. White W, Jonathan Jr (1975) Physical characteristics of honey. In: Honey: A Comprehensive Survey. Ed. E. Crane, Heinemann, London.
51. Knutson RA, Merbitz LA, Creekmore MA, Snipes HG (1981) Use of sugar and povidone-iodine to enhance wound healing: five year's experience. South Med J 74: 1329-1335.
52. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Douichene S (2012) The Relationship between Fructose, Glucose and Maltose Content with Diastase Number and Anti-Pseudomonal Activity of Natural Honey Combined with Potato Starch. Organic Chem Curr Res 1: 6
53. Ahmed M, Djebli N, Hammoudi SM, Aissat S, Akila B, et al. (2012) Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. Asian Pac J Trop Biomed 2: 253-255.
54. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Aggad H, Boucif Ahmed (2011) Antifungal Activity of a Combination of Algeria Honey and Starch of Ginger against *Aspergillus niger*. International Journal of Microbiological Research 2: 263-266.
55. Ahmed M, Aissat S, Djebli N, Boukabout A, Abdelmalek M, et al. (2011) The Influence of Starch of Ginger on the Antibacterial Activity of Honey of Different Types from Algeria against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. International Journal of Microbiological Research 2: 258-262.
56. Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E (2008) Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. Food Chem Toxicol 46: 3774-3779.
57. Silici S, Sagdic O, Ekici L (2010) Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. Food Chem 121: 238-243.
58. Escuredo O, Silva LR, Valentão P, Seijo MC, Andrade PB (2012) Assessing *Rubus* honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. Food Chem 130: 671-678.
59. Davidson PM (1993) Parabens and phenolic compounds. In: Davidson PM, Branen AL. (ed.), Antimicrobials in Foods. (2nd edn), Marcel Dekker, New York.
60. Ulusoy E, Kolayli S, Sarikaya AO (2010) Antioxidant and antimicrobial activity of different floral origin honeys from turkiye. J Food Biochem 34: 321-335.

Citation: Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Zerrouki K, Bourabeh A (2013) *In Vitro* Synergistic Antibacterial Activity of Natural Honey Combined with Curcuma Starch and their Correlation with Diastase Number, Flavonoid and Polyphenol Content. J Plant Pathol Microb 4:152. doi:10.4172/2157-7471.1000152

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 250 Open Access Journals
- 20,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: www.editorialmanager.com/



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.



ISSN:1948-5948

Journal of Microbial & Biochemical Technology

**The International Open Access
Journal of Microbial & Biochemical Technology**

Editor-in-Chief

Jeffrey L. Ram, PhD
Wayne State University, USA

Executive Editors

Tingyue Gu, PhD
Ohio University, USA

Abhijeet P. Borole, PhD
Oak Ridge National Laboratory, USA

Cheorl-Ho KIM, PhD
Sungkyunkwan University, Korea

Available online at: OMICS Publishing Group (www.omicsonline.org)

This article was originally published in a journal by OMICS Publishing Group, and the attached copy is provided by OMICS Publishing Group for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for commercial/research/educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are requested to cite properly.

Digital Object Identifier: <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000087>

Antiradical Activity and Total Phenolics of Algerian honeys and Antibacterial Effect against Gram-Negative Bacteria

Moussa Ahmed^{1*}, Nouredine Djebli², Saad Aissat¹, Baghdad Khiati¹, Meral Ünal³ and Salima Bacha¹

¹Institute of Veterinary Sciences, Ibn-Khaldoun University, Tiaret, Algeria

²Departments of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria

³Marmara University, Science and Art Faculty, Department of Biology, Göztepe, 34730 Istanbul, Turkey

Abstract

Six Algerian honeys from different floral origins, were examined for potential antibacterial and antiradical activity. The Folin-Ciocalteu assay was used to measure total phenol content (TPC) and the 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) assay was used to determine the scavenging activity of the honey samples. An agar well diffusion assay and spectrophotometric method were used to assess antibacterial activity against two Gram negative strains (*Escherichia coli* ATCC25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 50071). Total phenolic content varied from 63.93 to 95.36 mg/100 g honey as gallic acid equivalent. The DPPH radical scavenging assay was found for an average (30.14 % ± 9.28). The honey samples were found to inhibit all of the tested bacteria. Correlation existed between phenolic content and antiradical activity. Thus Algerian honeys, being a rich source of natural antioxidants, may be used in the prevention of various free radicals related diseases.

Keywords: Algerian honeys; Phenolic compounds; DPPH; Antiradical activity; Antibacterial activity

Introduction

The emergence of resistant Gram negative bacteria presents a major challenge for the antimicrobial therapy of infectious diseases and increases the incidence of mortality and morbidity. Natural products offer an alternative strategy for the discovery of new medications. Honey as most natural products, may have a large variance in therapeutic components depending on its origin. Thus, the floral source of honey plays an important role on its biological properties [1]. Honey has been reported to contain about 200 substances (complex mixture of sugars, but also small amounts of other constituents such as minerals, proteins, vitamins, organic acids, flavonoids, phenolic acids, enzymes and other phytochemicals) and is considered to be an important part of traditional medicine [2]. Many authors demonstrated that honey serves as a source of natural antioxidants, which are effective in reducing the risk of heart disease, cancer, immune system decline, different inflammatory processes [3]. The factor contributing to honey antioxidant activity are lysozyme, phenolic acids and flavonoid [4]. The flavonoids in honey are divided into three classes with similar structure: flavonols, flavones and flavonones according to their chemical structure. These are important due to their contribution to honey color, taste and flavour and also due to their beneficial effects on health [5]. Honey is between the Major dietary sources of flavanones, such as Naringenin, which has been shown to possess antioxidant [6], antiproliferative [7], and weakly estrogenic activities *in vitro* [8]. Chrysin a natural flavone commonly found in honey has been shown to possess an anti-proliferative effect on prostate cancer cells [9]. Quercetin is one of the more representative flavonols in honey [10-12]. The best described property of Quercetin is its ability to act as antioxidant. Quercetin seems to be the most powerful flavonoids for protecting the body against reactive oxygen species, produced during the normal oxygen metabolism or are induced by exogenous damage [13,14].

The phenolic acids are divided in two subclasses: the substituted benzoic acids and cinnamic acids. The actions of flavonoids as immune modulators, radical-scavenging activity, enzyme and hormone action inhibitors are currently of particular interest to medical and nutritionist practitioners and justify the consumption of natural products rich in

these phytochemical compounds for their beneficial potential effects [15]. Also the antioxidant activity of honey, however, varies greatly depending on the honey floral source [16]. As well by processing and storage conditions [17,18]. Honey has been shown to efficiently inhibit bacterial growth *in vitro* and *in vivo* [19]. The antimicrobial properties attributed to honey have been related to both the physical properties of osmosis and the antibacterial properties of hydrogen peroxide levels and the presence of some phytochemicals, mainly phenolic compounds including phenolic acids and flavonoids [20,21]. Numerous *in vitro* methods are used to evaluate the antioxidant potential of natural products [22-25] for honey antioxidant capacity determination, DPPH radical scavenging assay is a highly accepted method [26-29]. Algeria is characterized by a richness of polliniferous and melliferous resources. Several types of honey are produced in Algeria, where honey production is a traditional practice, well implanted in several regions. [30,31]. The antibacterial properties of Algerian honey have been reported in many studies [32-34]. In this study, the antioxidant activity (scavenging effect on DPPH radicals) and the antibacterial effects of six natural honeys from different floral origin two Gram negative strains *Escherichia coli* ATCC25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 50071 were tested by agar well diffusion method and spectrophotometric assay.

Material and Methods

Honey Samples and their Preparation

Six honey samples from different sources in Algeria Tiaret (H3, H4, H6); Saida (H1); Relizane (H5), and Mascara (H2). The floral origin

*Corresponding author: Moussa Ahmed, Institute of Veterinary Sciences, Ibn-KhaldounTiaret University, Algeria, Tel: + 213 65234059; E-mail: moussa7014@yahoo.fr

Received October 17, 2012; Accepted November 23, 2012; Published November 26, 2012

Citation: Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Khiati B, Ünal M, et al. (2012) Antiradical Activity and Total Phenolics of Algerian Honeys and Antibacterial Effect against Gram-Negative Bacteria. J Microb Biochem Technol 4: 152-156. doi:10.4172/1948-5948.1000087

Copyright: © 2012 Ahmed M, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

of the samples was specified by microscopic analyses of pollen grains at the laboratory Cari, Louvain-la-Neuve, Belgium. All samples were prepared aseptically and were handled such that they were protected from direct sunlight. Honey samples were stored at 4°C in the dark until analyzed.

Antibacterial activity of honey samples

Honey solutions were prepared in two concentrations: 100 and 50 % (by mass per volume). The samples of each honey (10 g) and sterile water were stored at 37°C for 30 min before mixing, to facilitate homogenization. The samples were assayed immediately after dilution. The potential antibacterial activity of six selected natural honeys against two strains of bacteria was studied using the agar well diffusion method and spectrophotometric assay.

Subculturing of test organisms and preparations of the bacterial inoculum

The test organisms were taken from American Type Culture Collections (ATCC): Two bacterial strains were used for the experiment: *E. coli* (ATCC 25922) and *P. aeruginosa* (ATCC 50071). Bacteria were selected for antibacterial activity assay. Cultures were obtained from the Laboratory of Microbiology, Faculty of SE & SNV, Mostaganem University, Algeria. Stock cultures were maintained on Mueller–Hinton Agar (MHA) at 4°C. Bacterial inocula were prepared by growing cells in Mueller–Hinton Broth (MHB) for 24 h, at 37°C. Cell suspensions were diluted in sterile MHB to provide initial cell counts of about 1×10⁶ colony-forming units per ml (CFU/ml).

Total phenolic content (TPC)

The total phenolic content was determined by the Folin–Ciocalteu method [35]. Thirty microliters (µl) of honey solution (0.1 g/ml) was mixed with 2.37 ml of milli Q water and 150 µl of 0.2 N Folin–Ciocalteu reagents. The solution was thoroughly mixed by vortexing and incubated for 2 min at ambient temperature. 450 µl of sodium carbonate solution (0.2 g/ml) was added to the reaction mixture and further incubated for 2 h at ambient temperature. The absorbance was measured at 765 nm using a spectrophotometer. The total phenolic content was determined by comparing with a standard curve prepared using gallic acid (0-200 mg/l). The mean of at least three readings was calculated and expressed as mg of gallic acid equivalents (mg GAE)/100 g of honey.

Determination of antiradical scavenging activity (DPPH)

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical scavenging effect (H/e- transferring ability) of honey samples was measured as per the method described by [36]. The DPPH was dissolved in absolute ethanol to a 0.2 mM concentration. A 100 µl aliquot of honey solution (0.1 g/ml) was diluted to 500 µl with 70% ethanol, and vigorously mixed with 400 µl of DPPH solution by vortexing. The mixture was incubated at room temperature for 15 min and the absorbance of the solution (T1) was measured at 517 nm. Sample blank (B1) consisted of 600 µl of 70% ethanol and 400 µl of DPPH whereas DPPH blank (B2) contained 100 µl of honey sample, 500 µl of 70% ethanol and 400 µl of absolute ethanol. The DPPH scavenging activity was calculated using the following formula:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \frac{1 - (T_1 - B_2)}{B_1} \times 100$$

where T1, B1, and B2 are the absorbencies of the sample, sample blank and DPPH blank, respectively.

Well diffusion assay

The activity of six stingless bee honeys was assessed against two reference strains *P. aerogenosa* ATCC 50071 and *E. coli* ATCC 25922 using an agar well diffusion assay. Briefly, agar plates (90 mm) containing 20 ml of MHA were inoculated using a swab from a suspension of each organism containing c. 1×10⁶ CFU ml⁻¹. An 8-mm diameter well was cut into the agar and 100 µl of 50 and 100% honey solution (w / v, prepared in sterile distilled water) was aliquoted into the well. The controls were set up with equivalent quantities of water as controls. The plates were incubated at 35 ± 2°C for 24 hours. Zones of inhibition were measured using a Vernier caliper (Draper). The antibacterial potential of test compound was determined on the basis of mean diameter of zone of inhibition around the wells in millimeters. Each assay was performed in duplicate and repeated twice. The antibacterial activity was classified as: no sensitive, for diameters lower than 8 mm; sensitive, for diameters from 8 to 14 mm; very sensitive, for diameters from 15 to 19 mm; extremely sensitive, for diameters higher than 20 mm.

Spectrophotometric assay

The absorbance readings obtained from the dose-response curve were used to construct growth inhibition profiles using the following formula:

$$\% \text{ growth inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{experimental}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Statistical analysis

All analyses were carried out in triplicate and the data were expressed as means ± standard deviations (SD). Statistical analyses were performed using the software Statistica 8.0 (Stat Soft). Differences between means at the 95% (p < 0.05) confidence level were considered statistically significant. Correlations were obtained by Pearson's correlation coefficient (r) in bivariate linear correlations.

Results and Discussion

The total phenolic content (TPC)

Polyphenols are an important group of compounds regarding the appearance and the functional properties of honey. They are members of a class of natural compounds, recently considered of high scientific and therapeutic interest. In the long human tradition, honey has been used not only as a nutrient but also as a medicine [37]. TPC of the different monofloral and unifloral honeys was investigated by the Folin–Ciocalteu assay and the mean values and standard deviation are shown in table 1. The total phenolic content (mg GAE/100 g of honey) of Algerian honeys was found in the range of 63.93 to 95.36, which was determined using gallic acid as standard (R²=0.9988) table 1. The total phenolic content of certain honey samples has been previously

Honey	Total polyphenol Content (mg/100 g ± SD)*	DPPH scavenging activity (% ± SD)*
H1	85.62 ± 2.75	26.93 ± 3.22
H2	95.36 ± 6.08	22.49 ± 11.71
H3	82.85 ± 14.24	29.76 ± 5.36
H4	65.31 ± 1.60	42.65 ± 22.34
H5	64.29 ± 1.55	28.95 ± 46.4
H6	63.93 ± 0.11	30.11 ± 8.45
Mean	75.89 ± 6.20	30.14 ± 9.28

*Values are means of triplicate determinations. DPPH (2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)

Table 1: Total polyphenol content and DPPH scavenging activity of tested honeys.

determined [38-40] for example Meda et al. [41] reported that total phenols of Burkina Fasan honey were 32.59-114.75 mg GAE/100 g. A similar level of phenolic content was also observed for Romanian honeydew honeys for which the phenolic content varied from 23.0 to 125.0 mg GAE/ 100 g [42]. For Indian and Croatian honeys, the phenolic content ranged from 48 to 99 and 31.72 to 80.11 mg GAE/ 100 g, respectively [43,44].

DPPH scavenging activity

The radical scavenging effects of Algerian honey were tested using methanolic solution of the DPPH free radical which exhibits a deep purple colour with maximum absorption at 517 nm. The DPPH free radical has the advantage of being unaffected by certain side reactions, such as metal ion chelation and enzyme inhibition [45]. The results obtained for DPPH radical scavenging activity of these honeys are summarized in table 1. The percentage DPPH scavenging activity ranged from (22.49 ± 11.71) % to (42.65 ± 22.34) %. table1. These values are similar to 23.81%-100% as reported by Wilczyńska [46] for Polish honey respectively. The activity was also within a lower range of 2.30 % and 90.73 % reported for Turkish honey [47].

Correlation between the polyphenol contents and antiradical activity

The correlation between DPPH activities and total polyphenol contents in 6 honey samples are analyzed in this study and the results are presented in figure 1. The coefficients of correlation between the total phenolic content of six honeys and values obtained with DPPH scavenging activity were calculated.

Inhibitory activity evaluation

The antibacterial activity of the 6 honey samples was first measured by agar well diffusion and spectrophotometric method, which is suitable for a previous screening test. In the antibacterial screening, solutions with different percentage of honey were used in the assay. The presence and diameter of zones of inhibition are dependent on the honey concentrations. Figure 2 and 3 the inhibitory capacity of honeys of the same botanical origin is variable and the honey effect on the growth of both microorganisms could be different figure 4 and 5

Antibacterial activities of the honey samples with 50 % concentration against *P. auregenosa* and *E. coli* strains are presented in figure 2 and 3. The inhibition zones of honey samples varied from (23-40) mm by *P. auregenosa* to (29-35) mm by *E. coli*. Antibacterial

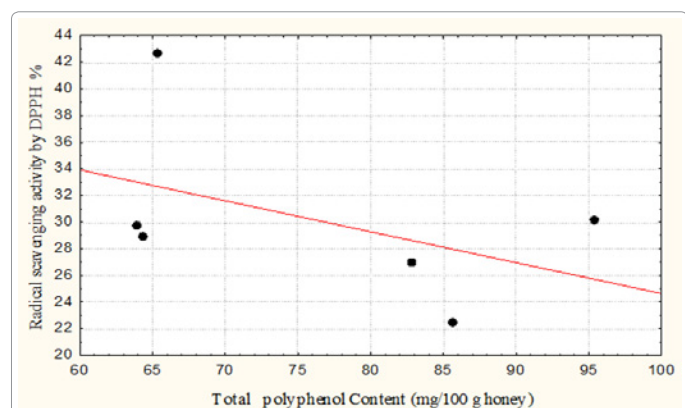


Figure 1: Correlation between DPPH values and total polyphenol contents in honey samples ($R^2 = 0.414$, $p < 0.05$).

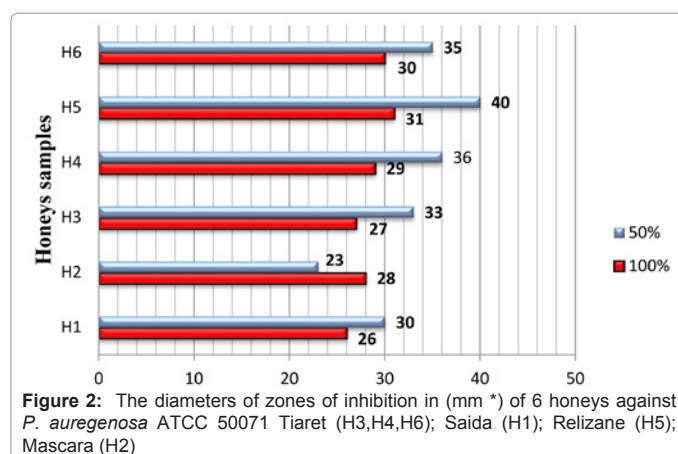


Figure 2: The diameters of zones of inhibition in (mm *) of 6 honeys against *P. auregenosa* ATCC 50071 Tiaret (H3,H4,H6); Saida (H1); Relizane (H5); Mascara (H2)

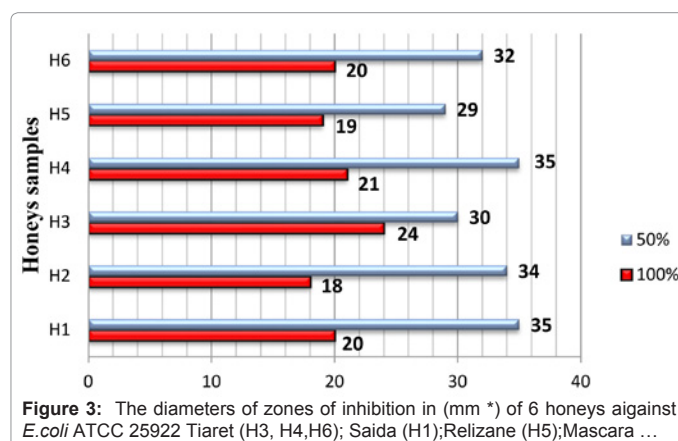


Figure 3: The diameters of zones of inhibition in (mm *) of 6 honeys against *E. coli* ATCC 25922 Tiaret (H3, H4,H6); Saida (H1);Relizane (H5);Mascara ...

activities of the honey samples with 100 % concentration against *P. auregenosa* and *E. coli* strains are presented in Figure 2 and 3. The inhibition zones of honey samples varied from (26-31) mm by *P. auregenosa* to (18-24) mm by *E. coli*. The growth inhibition profiles of natural honeys are presented in Figure 4 and 5. A variation in the antibacterial activity with floral source was observed at 50 and 100% concentration, some inhibitory effect was observed on all pathogens. Honey has a broad spectrum of bactericidal and bacteriostatic activities [48,49]. Several bioactive compounds have been identified in honey which contributed to its antibacterial action. The antibacterial property of honey is dependent on several contributing factors. Low water content, high osmolarity (high sugar content), low pH, antibiotic peptides, methylglyoxal, catalase to hydrogen-peroxide ratio, Maillard reaction products, bee defensin-1, production of hydrogen peroxide, although involved in antibacterial action, are common properties for all honeys and could not explain the variability in activity between honeys. From surveys of antibacterial activity in different honeys, it became clear that a phytochemical composition of honeys was responsible for the degree of bacteriostatic and bactericidal action [50-59]. Phenolic compounds originating from plant nectar have been proposed as important factors for the no peroxide antibacterial activity of honey [60]. Several antibacterial phenolic compounds have been identified in honeys [61-63]. Davidson et al. [64] have shown that individual phenolic compounds have growth inhibition on a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. In a recent study Ahmed et al. [33] reported that *E. coli* is more sensitive to the action of honey than *P. aeruginosa*. The results of this study clearly show that honey has the

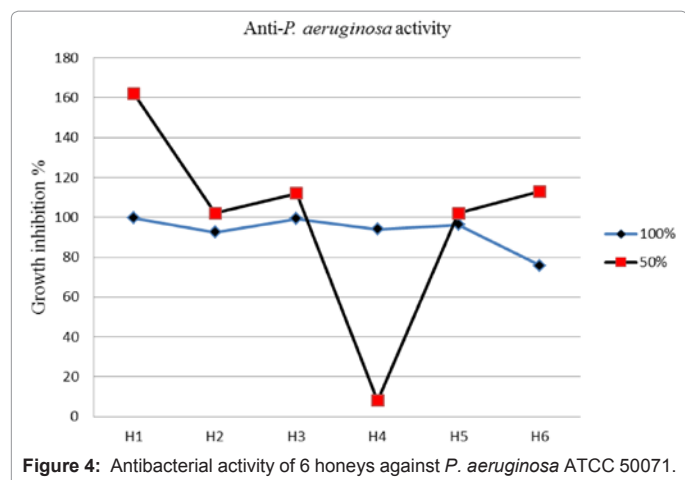


Figure 4: Antibacterial activity of 6 honeys against *P. aeruginosa* ATCC 50071.

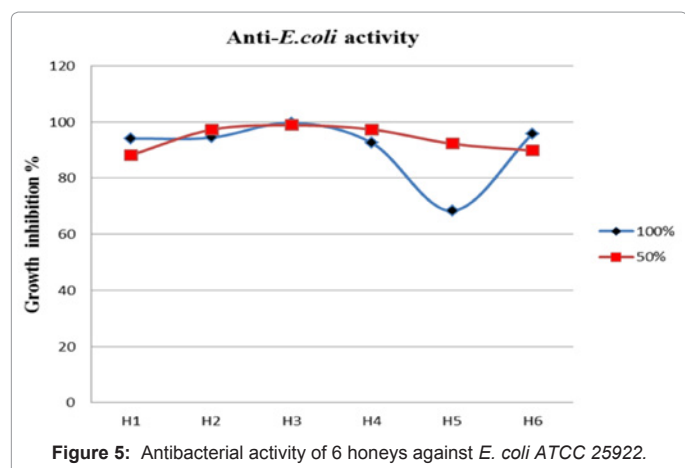


Figure 5: Antibacterial activity of 6 honeys against *E. coli* ATCC 25922.

potential to be used as an antibacterial agent to prevent and control infection with gram-negative bacteria.

Conclusions

This study gave an overview on the antibacterial activity of honey from Algeria and showed that many honeys have potential for therapeutic use as antibacterial agents. Phenolic compounds play a major role in the antibacterial activity of honey and the differences between honey samples in terms of antibacterial and antioxidant activity could be attributed to the natural variations in floral sources of nectar and the different locations. The results obtained, in the inhibitory activity assays, show that the spectrophotometric method is an easy and useful tool in the evaluation of the antibacterial capacity of honeys against *P. aeruginosa* and *E. coli*.

Nevertheless, further studies including other bacterial strains are necessary in order to confirm the utility of this technique for the evaluation of the non-peroxidic antibacterial activities of Algerian honeys.

Acknowledgments

Authors are thankful to staff of Mostaganem University for providing material.

References

- Molan PC (2002) Not all honeys are the same for wound healing. Bulletin of the European Tissue Repair Society 9: 5-6.
- White JW (1979) Composition of honey. Honey: A comprehensive survey

London: Heinemann 157-158.

- The national honey board (2003) Honey – Health and therapeutic qualities.
- Snowdon JA, Cliver DO (1996) Microorganisms in honey [J]. Internat J Food Microbiol 31: 1-26.
- Devarajan S, Venugopal S (2012) Antioxidant and α -amylase inhibition activities of phenolic compounds in the extracts of Indian honey. CJNM 10: 0255-0259.
- Wang W, Goodman MT (1999) Antioxidant property of dietary phenolic agents in a human LDL-oxidation ex vivo model: interaction of protein binding activity. Nutr Res 19: 191-202.
- Manthey JA, Guthrie N (2002) Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 5837-5843.
- Miksicek RJ (1993) Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. Mol Pharmacol 44: 37-43.
- Samarghandian S, Afshari JT, Davoodi S (2011) Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. Clinics 66: 1073-1079.
- Tomas-Barberan F, Espín JC (2001) Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. J Sci Food Agric 81: 853-876.
- Soler C, Gil MI, Garcia-Viguera C, Tomas-Barberan FA (1995) Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. Apidologie 26: 53-60.
- Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyszynska K (2008) Solidphase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. Journal of Chromatography A 1187: 18-24.
- De Groot H (1994) Reactive oxygen species in tissue injury. Hepatogastroenterology 41: 328-332.
- Grace PA (1994) Ischaemia-reperfusion injury. Br J surg 81: 637-647.
- Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther 96: 67-202.
- Gheldof N, Engeseth NJ (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. J Agric Food Chem 50: 3050-3055.
- Wang XH, Gheldof N, Engeseth NJ (2004) Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. J Food Sci 69: 96-101.
- Antony SM, Han IY, Rieck JR, Dawson PL (2000) Antioxidative effect of Maillard reaction products formed from honey at different reaction times. J Agric Food Chem 48: 3985-3989.
- Brudzynski K, Kim L (2011) Storage-induced chemical changes in active components of honey de-regulate its antibacterial activity. Food Chem 126: 1155-1163.
- Taormina PJ, Niemira BA, Beuchat LR (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. Int J Food Microbiol 69: 217-225.
- Weston RJ, Brocklebank LK, Lu Y (2000) Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. Food Chem 70: 427-435.
- Snow MJ, Manley-Harris M (2004) On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. Food Chem 84: 145-147.
- Aljadi AM, Kamaruddin MY (2002) Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. Food Chem 85: 513-518.
- Jerković I, Marijanović Z (2010) O Oak (*Quercus frainetto* Ten.) Honeydew Honey—Approach to Screening of Volatile Organic Composition and Antioxidant Capacity (DPPH and FRAP Assay). Molecules 15: 3744-3756.
- Frankel S, Robinson GE, Berenbaum MR (1998) Antioxidant capacity and correlated characteristic of 14 unifloral honeys. J Apicultural Res 37: 27-31.
- Serem JC, Bester MJ (2012) Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. Food Chem 133: 1544-1550.

27. Lachman J, Orsák M, Hejtmánková A, Kovářova E (2010) Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT-Food Sci Technol* 43: 52-58.
28. Pérez RAM, Hortiguëla LV, Lozano PL, Rojo Cortina MD, Carretero CL (2008) *In Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activities of Spanish Honeys. *Int J Food Prop* 11: 727-737.
29. McKibben J, Engeseth NJ (2002) Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground Turkey. *J Agric Food Chem* 50: 592-595.
30. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Meslem AM, Bacha S (2012) The Influence of Botanical Origin and Physicochemical Parameters on the Antifungal Activity of Algerian Honey. *J Plant Pathol Microb* 3: 5.
31. Ouchemoukh S, Schweizer P, Bachir Bey M, Djoudad-Kadji H, Louaileche H (2010) HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem* 121: 561-568.
32. Ahmed M, Djebli N, Meslem AM, Aissat S (2012) Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram-Positive cocci: *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Asian Pac J Trop Med* 773-776.
33. Ahmed M, Djebli N, Meslem AM, Aissat S (2012) Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram-Negative Bacilli: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Disease* 2: 211-214.
34. Ahmed M, Aissat S, Djebli N, Boukaboul A, Meslem AM, et al. (2011) The Influence of Starch of Ginger on the Antibacterial Activity of Honey of Different Types from Algeria against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *IJMR* 2: 258-262.
35. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
36. Chen HY, Lin YC, Hsieh CL (2007) Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chem* 104: 1418-1424.
37. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Diaz D, Estevez Y, Romandini S, et al. (2010) Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol* 48: 2490-2499.
38. Khalil MI, Alam N, Moniruzzaman M, Sulaiman SA, Gan SH (2011) Phenolic Acid Composition and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys. *J Food Sci* 76: 921-928.
39. Brudzynski K, Miotto D (2011) The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chem* 124: 869-874.
40. Islam A, Khalil I, Islam N, Moniruzzaman M, Mottalib A, et al. (2012) Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12: 177.
41. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91: 571-577.
42. Al ML, Daniel D, Moise A, Bobis O, Laslo L, et al. (2009) Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chem* 112: 863-867.
43. Saxena S, Gautam S, Sharma A (2010) Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem* 118: 391-397.
44. Krpan M, Marković K, Šarić G, Skoko B, Hruškar M, et al. (2009) Antioxidant activities and total phenolics of acacia honey. *Czech J Food Sci* 27: S245-S247.
45. Amorowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA (2004) Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* 84: 551-562.
46. Wilczyńska A (2010) Phenolic content and antioxidant activity of different types of Polish honey – short report. *Pol J Food Nutr Sci* 60: 4: 309-313.
47. Silici S, Sagdic O, Ekici L (2010) Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chem* 121: 238-243.
48. Dong R, Zheng Y, Xu B (2011) Phenolic Profiles and Antioxidant Capacities of Chinese Unifloral Honeys from Different Botanical and Geographical Sources. *Food Bioprocess Technol*.
49. Molan PC (2002) Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers - theory and practice. *Ostomy Wound Manage* 48: 28-40.
50. Allen KL, Molan PC, Reid GM (1991) A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm Pharmacol* 43: 817-822.
51. Ceyhan N, Ugur A (2001) Investigation of in vitro antimicrobial activity of honey. *Riv Biol* 94: 363-371.
52. Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM (2005) Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Res* 36: 464-467.
53. Mundo MA, Padilla-Zakour OI, Worobo RW (2004) Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int J Food Microbiol* 97: 1-8.
54. Wilkinson JM, Cavanagh HM (2005) Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Food* 8: 100-103.
55. Aljadi AM, Yusoff K (2003) Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turk J Med Sci* 33: 229-236.
56. Kwakman PH, de Boer L, Ruyter-Spira CP, Creemers-Molenaar T, Helsper JP, et al. (2011) Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 251-257.
57. Adams CJ, Boulton CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MN, et al. (2008) Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 343: 651-659.
58. Weston RJ (2000) The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review. *Food Chem* 71: 235-239.
59. Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T (2008) Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res* 52: 483-489.
60. Kwakman PH, Zaat SA (2012) Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life* 64: 48-55.
61. Russell KM, Molan PC, Wilkins AL, Holland PT (1990) Identification of some antibacterial constituents of New-Zealand Manuka honey. *J Agric Food Chem* 38: 10-13.
62. Weston RJ, Brocklebank LK, Lu YR (2000) Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chem* 70: 427-435.
63. Isla MI, Craig A, Ordonez R, Zampini C, Sayago J, et al. (2011) Physico-chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. *LWT-Food Sci Technol* 44: 1922-1930.
64. Davidson PM, Sofos JN, Brenem AL (2005) *Antimicrobials in Foods*. (3rd edn), Marcel Dekker Inc, New York, USA.

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 200 Open Access Journals
- 15,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.editorialmanager.com/jmbt>

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.



ISSN:2157-7471

Journal of Plant Pathology & Microbiology

**The International Open Access
Journal of Plant Pathology & Microbiology**

Executive Editors

Chandradhar Dwivedi
South Dakota State University, USA

Rodrigo A. Valverde
Louisiana State University, USA

Leland Stanley Pierson III
University of Arizona, USA

C.O. Thoen
Iowa State University, USA

Guangming Zhong
University of Texas, USA

Available online at: OMICS Publishing Group (www.omicsonline.org)

This article was originally published in a journal by OMICS Publishing Group, and the attached copy is provided by OMICS Publishing Group for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for commercial/research/educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are requested to cite properly.

Digital Object Identifier: <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000132>

The Influence of Botanical Origin and Physico-chemical Parameters on the Antifungal Activity of Algerian Honey

Ahmed Moussa^{1*}, Djebli Nouredine², Aissat Saad¹, Meslem Abdelmalek¹ and Bacha Salima¹

¹Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun Tiaret, Algeria

²Department of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria

Abstract

The purpose of the study was to characterize the physicochemical of 6 natural honeys, and to evaluate the antifungal activity of honey. Honey samples were collected from different locations of Algeria Republic. Pollen profile, moisture content, ash, electrical conductivity and pH, were the parameters analyzed in each honey sample. The antifungal activity of honey samples were tested by 100% and 50% (wt per vol) concentration against *Candida albicans* and *Rhodotorula mucilaginosa*, and by the agar well diffusion method and spectrophotometric assay. Ketoconazole 2% and Nystatin (100 U), were used as positive controls.

The floral identification of honeys allowed to cluster them, as monofloral and polyfloral honeys. Concerning the physicochemical parameters, all honey samples were found to meet European Legislation (EC Directive 2001/110) for all parameters. The mean values obtained for the physico-chemical parameters were: pH 4.1; 15.31% moisture; 0.24% ash, 0.39 ms cm⁻¹ electrical conductivity and 11.95 free acidity. Inhibition zones for *C. albicans* (6 to 10 mm) and *R. mucilaginosa* (6 to 20 mm) were observed. Also, the percentage inhibition(%) for *C. albicans* (69.76 to 99.85) and *R. mucilaginosa* (83.03 to 99.77). The antifungal activity of honeys is related to their floral origin, and physicochemical properties constitute a useful resource for the generation of functional foods.

Keywords: Algerian honey; Botanic origin; Physicochemical parameters; Antifungal activity

Introduction

In recent years, fungal infections, mainly caused by *Candida albicans* and *Rhodotorula mucilaginosa*, are a major cause of morbidity and mortality, and may be life threatening, predominantly in the group of severely immunocompromised patients.

The increased use of antifungal agents also, resulted in the development of resistance to the present drugs. It makes necessary to discover new classes of antifungal compounds, to cure fungal infections. Natural products have been traditionally used in the treatment of diseases, because they are sources of many active compounds. Honey as most natural products, may have a large variance in therapeutic components depending on its origin. Thus, the floral source of honey plays an important role on its biological properties [1].

The composition of honey is rather variable and depends primarily on its floral source; however, certain external factors, such as seasonal and environmental factors and processing, also play a role. The various varieties of honey may be grouped into monofloral or multifloral [2]. The classification basically depends on whether a dominating pollen grain, originated from only one particular plant (monofloral honey) or no dominant pollen type in the sample (multifloral honey) [1,3].

The antimicrobial effect of honey is due to different substances and depends on the botanical origin of honey [4-6]. An extensive review of the antimicrobial activity of honey showed it to be derived from high sugar content, low water content, acidity, the generation of hydrogen peroxide on dilution and phytochemical components [5]. More recently, methylglyoxal was discovered to contribute to the activity of New Zealand's manuka honey [7,8] bee defensin-1 was detected in a Dutch honey [9], and melanoidins were identified in Canadian honeys [6].

In Algeria, thanks to geographical and climatic conditions that provide a suitable environment for apiculture, honey production has

been well developed. The beekeeping that has been sustained in Algeria for thousands of years, is an important agricultural activity. Recently, we reported antibacterial and antifungal properties of Algerian honeys [10-14]. The aim of this work was to evaluate the physicochemical parameters and antifungal activity characteristics of honey of different botanical sources, from four geographic origin of Algeria.

Materials and Methods

Honey samples and their Preparation

A total number of 6 honey samples were obtained from beekeepers in four regions of western Algerian: Saida (n=1); Tiaret (n=3); Relizane (n=1); Mascara (n=1) (Table 1). All samples were collected in their original packages and were transferred to the laboratory, and kept at 4-5°C, until analysis.

Pollen analysis

The preparation of honey samples for identification of botanical origin, followed the standardized method of Erdtman G [15]. Pollen identification was based on the reference collection from the LABORATOIRE DU CARI LOUVAIN-LA-NEUVE (Belgique).

***Corresponding author:** Ahmed Moussa, Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun Tiaret (14000), Algeria, Tel: +213 65234059; Fax: +213 46 425001; E-mail: moussa7014@yahoo.fr

Received August 12, 2012; **Accepted** September 19, 2012; **Published** September 24, 2012

Citation: Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Meslem A, Bacha S (2012) The Influence of Botanical Origin and Physico-chemical Parameters on the Antifungal Activity of Algerian Honey. J Plant Pathol Microb 3:132. doi:[10.4172/2157-7471.1000132](https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000132)

Copyright: © 2012 Moussa A, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Sample	Description	Collection	
		Season	Place of origin
H1	Unifloral	2011	Saida
H2	Multifloral	2011	Mascara
H3	Multifloral	2011	Tiaret
H4	Unifloral	2011	Tiaret
H5	Unifloral	2011	Relizane
H6	Multifloral	2011	Tiaret

Table 1: Collection location, description and time of collection, of natural honey samples from Algeria.

Physicochemical analyses

All physicochemical tests were performed in triplicate: Water content (moisture) was determined by an Abbe-type refractometer reading at 20°C, according to the relationship between honey water content and refractive index [6,16].

Measurements of pH were performed with a pH meter ((Hanna Instruments), in a solution containing 10 g of honey in 75 ml of CO₂ free distilled water.

Honey electrical conductivity was measured at 20°C [17] with a Crison Basic 30 conductimeter. Results were expressed in microSiemens per centimeter (µS/cm) [9,18].

Ash content

Total ash was estimated by conductimetry, using the equation:

$$\text{Ash content (\%)} = 0,083 - \text{conductivity} - 0,092 [19]$$

Free acidity

Free acidity was determined by potentiometric titration [17]. Honey samples were homogenized in a water bath and filtered through gauze, prior to analysis. Ten grams of honey were then dissolved in 75 mL of distilled water, and alcoholic solution of phenolphthalein added. The solution was titrated with 0.1 N NaOH. Acidity (milliequivalent of acid per kg of honey) was determined, as 10 times the volume of NaOH used in titration.

Antifungal activity

Honey solutions were prepared in two concentrations: 100% and 50% (wt/vol). The samples of each honey (10 g) and sterile water were stored at 37°C for 30 min before mixing, to facilitate homogenization. The potential antifungal activity of 6 selected natural honeys, against two species of fungi was studied, using the spectrophotometric assay and agar well diffusion method.

Culture media and inoculum

Candida albicans ATCC 10231 and *Rhodotorula mucilaginosa* (clinical isolate), were grown on Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Merck, Germany), for 24 h at 37°C. Yeast cells from at least five colonies (1 mm diameter) were suspended in 5 mL of sterile saline solution (0.85%), and the resulting yeast suspension was mixed for 15 s in a vortex. Then, the suspensions were adjusted by spectrophotometric method, adding saline solution, to reach the value of 0.5 in the McFarland scale corresponding to a final concentration of $3.0 \pm 2.0 \times 10^6$ cells/ mL.

Agar well diffusion method

The agar well diffusion method was employed. The honey samples were first inoculated separately on standard nutrient media with no test organisms, so as to evaluate their possible contamination. Thereafter, solidified SDA agar plates (90 mm diameter) were separately flooded

with the liquid inoculums of the different test organisms, using the spread plate method. The plates were drained and allowed to dry at 37°C for 30 min, after which four equidistant wells of 8mm in diameter were punched, using a sterile cork borer at different sites on the plates. 50 µl of the different concentrations, 50% (wt/vol), and undiluted of the honey samples were separately placed in the different punched wells with 1 ml sterile syringe. The plates were allowed to stay for 15 min for pre-diffusion to take place, followed by an overnight incubation that lasted for 28 h at 37°C. The diameter of inhibition zones, including the diameter of the well, was recorded. The experiment was repeated twice.

Spectrophotometric assay

Up to 0.2 ml of the cell suspension was inoculated into 4 ml volume of honey concentration in a test tube, while inoculation of 4 ml volume of nutrient broth with 0.2 ml of the cell suspension, served as control. The optical density was determined in a spectrophotometer at 620 nm, prior to incubation (T₀) and recorded after which, the cultures were incubated for 24 hours in the dark at 37°C with constant shaking, to prevent adherence and clumping. After 24 hours of incubation, the optical densities were again determined (T₂₄) and recorded. The optical density for each replicate at T₀ was subtracted from the optical density for each replicate at T₂₄. The growth inhibition for the test at each dilution was determined, using the formula: Percentage inhibition = $1 - (\text{OD test}/\text{OD control}) \times 100$.

Where the resulting measurement recorded a negative inhibition value (growth promotion), this was reported as stimulation using the formula: Percentage inhibition = $(\text{OD test}/\text{OD control}) \times 100$. The minimum and maximum values were 0% and 100%.

Results and Discussion

Results of honeys pollen profile analysis permits to determinate its floral origin. The identified pollens and its frequency on the six analyzed honeys are presented on Table 1. The most relevant differences among the five honeys were the type and amount of the most predominant pollen present in them.

The percentages of the most abundant pollen types in each honey sample, as well as the nectar and pollen character of these plants were taken into account. Following the criteria of Zander [20], when the percentage of the most abundant pollen type was over 45%, the honey sample was classified as unifloral, with an exception of eucalyptus pollen at 70%. Lower percentages were classified as polyfloral (Table 2).

Physicochemical parameters

The six honey samples were studied, in terms of chemical properties, and tests were performed in triplicate. Moisture is a parameter related to the maturity degree of honey and temperature. In the present study, moisture values are between 13.76% and 16.30% (Table 3). One sample with 20.2% exceeded the limit (20%) allowed by European Community regulations, The Council of the European Union [21]. Moisture values were within the values found in Morocco honeys (between 14.64% and 18.59%) Chakir et al. [22] and less than those found in Moroccan honeys (between 14.5% and 23.6%) Terrab et al. [23]. The moisture content of honey depends on various factors such as harvesting season, degree of maturity reached in the hive and climatic factors Finola et al. [24]. Also, the moisture content of honey is highly important factor contributing to its stability against fermentation and granulation during storage [25].

All the Algerian honeys analysed were found to be acidic in character. Their pH values ranged from 4 to 4.6 (Table 3). In general,

Sample/Colour	Frequency class ^a	Pollen identification (frequency)
Honey 1	A* S I	Apiacées (48%) Ronces (15%), Brassicacées (16%) Renoncule, Astéracées, Lamiacées, Trèfle, Cistacée, Rosacées, Fabacée
Honey 2	S I	Rosacées (13%), Fabacée (23%) , Apiacées (24%) Chénopodiacées, Convolvulacées, Lamiacées, Malvacées, Plantain, Poacées, Viperines, Eucalyptus, Renoncule, Cistacée, Rhamacées, Ronces , Brassicacées, Astéracées
Honey 3	A* S I	Rhamnacées (47%) Astéracées (17%), Eucalyptus (18%) Lamiacées, Lotier, Vesce, Ronces , Brassicacées, Rosacées, Apiacées, Fabacée
Honey 4	A* I	Eucalyptus (87%) Plantain, Renoncule, Viperine, Apiacées, Brassicacées, Cistacée, Citrus, Ronces , Fabacée, Astéracées, Rosacées
Honey 5	S I	Astéracées (13%), Apiacées (23%), Brassicacées (25%), Oranger (27%) Acacia, Rosacées, Cistacée, Lamiacées, Renoncule, Ronces, Fabacée , Eucalyptus
Honey 6	A* S I	Astéracées (62%) Rosacées (11%), Brassicacées (16%) Lamiacées, Vesce, Apiacées, Chénopodiacées, Eucalyptus, Fabacée, Ronces

Table 2: ^aFrequency classes: P – predominant pollen (more than 45% of pollen grains counted); S – secondary pollen (10–40%); I – important minor pollen (< 10%).

Physico-chemical analysis	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Moisture %	16.04 ± 0.2	13.76 ± 0.2	14.87 ± 0.2	14.68 ± 0.2	16.3 ± 0.2	16.24 ± 0.2
PH	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4 ± 0.2	4 ± 0.2	4.2 ± 0.2
Free acidity (meq Ac/kg)	17.3 ± 1.05	15.2 ± 1.05	8.3 ± 1.05	11.3 ± 1.05	9.9 ± 1.05	9.7 ± 1.05
Electrical conductivity (mS/cm)	0.52 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.28 ± 0.01
Ash %	0.35 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.15 ± 0.01

Table 3: Results of physic-chemical parameters of 6 Algerian honey samples (mean ± standard deviation, n = 3).

honey is acidic in nature, irrespective of its variable geographical origin. The pH values of Indian, Morocco, Argentinean honeys and Saudi honeys, have been found to vary between 3.7 to 4.4, 3.91 to 4.93, 3.25 to 3.32 and 3.48 to 6.06, respectively [26–28]. This parameter is of great importance, during extraction and storage of honey, as it influences the texture, stability and shelf life of honey [29].

Ash content is one of these parameters that have been associated with botanical and geographical origins of honey samples. The ash content in honey is generally small, and depends on nectar composition of predominant plants in their formation [8].

Its value in the analysed samples, ranged from 0.08 to 0.35 g% (Table 3). These results are good agreement with those of Al-Khalifa et al. [30], Sahinler and Gul [31] and Sudhanshu S et al. [32].

The electrical conductivity values of honey samples, tested in our study are listed in (Table 3).

The electrical conductivity (mS/cm) in honey samples, varied in the range of 0.20- 0.52. A linear relationship is known to exist between the ash content and the electrical conductivity, which is expressed as $C = 0.14 + 1.74 A$, where C is the electrical conductivity and A is the ash content Bogdanov et al. [33]. The coefficient of correlation between

electrical conductivity and ash was found to be 0.98, which indicated a strong positive correlation between the two parameters. Similarly, a correlation value of 0.92 has been found to exist between the electrical conductivity and ash content, for some Algerian honeys [28]. The electrical conductivity of honey is closely related to the concentration of mineral salts, organic acids and proteins. This parameter shows great variability according to the floral origin, and is important for differentiating honeys of different floral origins.

The values of acidity obtained ranged from 8.3 meq/ kg in honey harvested, using modern method to 17.3 meq/kg (Table 3) in honey harvested using traditional method.

All honeys presented free acidity values, below 40 meq NaOH kg⁻¹. Free acidity may be explained by taking into account the presence of organic acids, which are proportional to the corresponding lactones, or internal esters, and some inorganic ions such as phosphate or sulphate [24]. Makhloufi et al. reported total acidity of honey from different regions of Algeria, to range from 3.0 to 22.5 meq/ kg, and this indicated the absence of undesirable fermentation. Sahinler and Gul [31] also reported varying acidity values for honey produced from sunflower, cotton, orange and pine to be 40.73, 25.24, 34.96 and 25.76 meq/ kg, respectively.

Inhibitory activity evaluation

The antifungal activity of the 6 honey samples was first measured by agar diffusion, which is suitable for a previous screening test.

The growth inhibition profiles of six honeys are presented in figure 1 and 2. A variation in the antifungal activity with floral source was observed.

These results are in accordance with those reported in other studies, which showed that the response of the different bacterial species to the treatment with a certain honey sample, is rather dependent on the type of honey and the individual organism within a category.

Fungal infection is becoming a serious medical problem, because of the difficulty of its control in immunocompromised individuals, and because of the emergence of multidrug-resistant fungi, although a variety of antifungal drugs have been developed [34,35]. *Rhodotorula species*, including *R. mucilaginosa* (*R. rubra*) and *R. glutinis*, are often resistant to fluconazole and voriconazole [36]. The treatment of invasive *Candida* infections is often complicated by high toxicity, low tolerability or a narrow spectrum of activity of the current antifungal

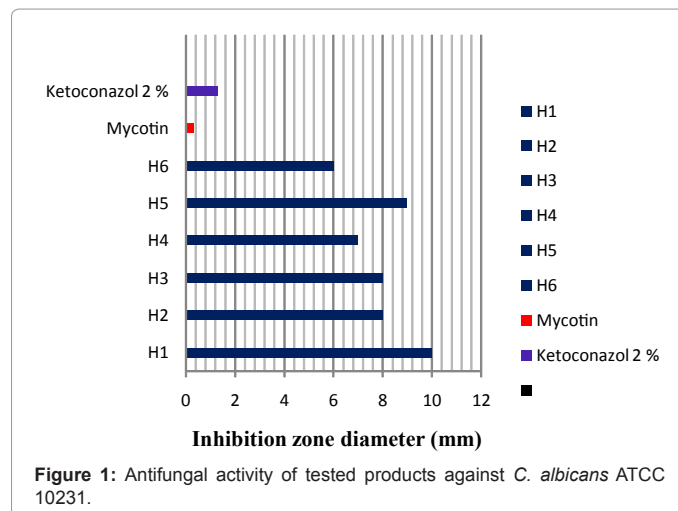


Figure 1: Antifungal activity of tested products against *C. albicans* ATCC 10231.

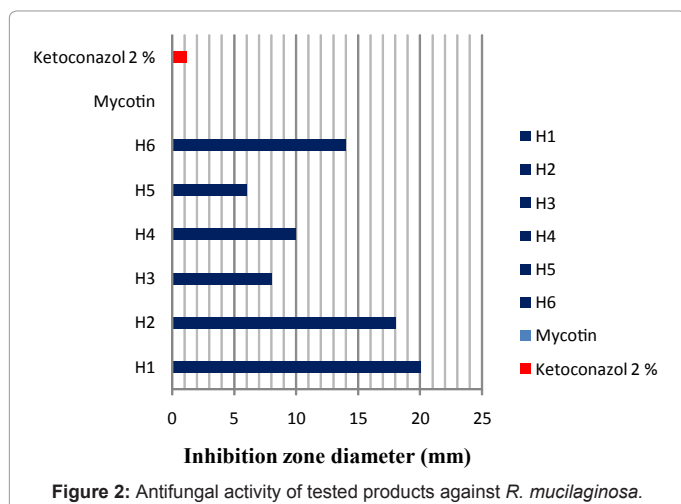


Figure 2: Antifungal activity of tested products against *R. mucilaginosa*.

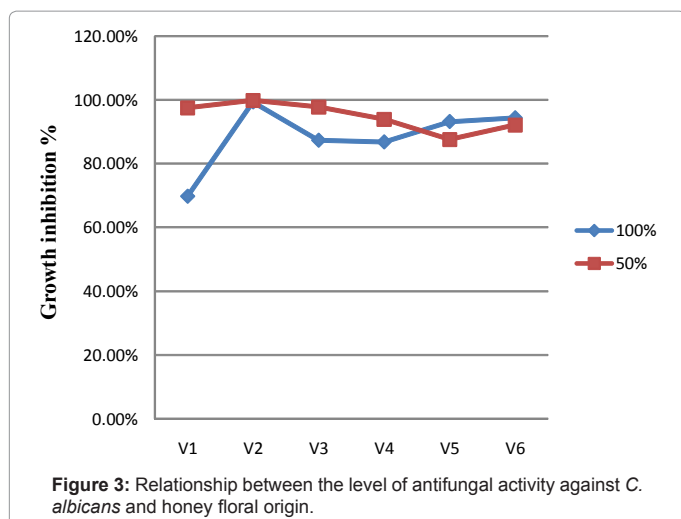


Figure 3: Relationship between the level of antifungal activity against *C. albicans* and honey floral origin.

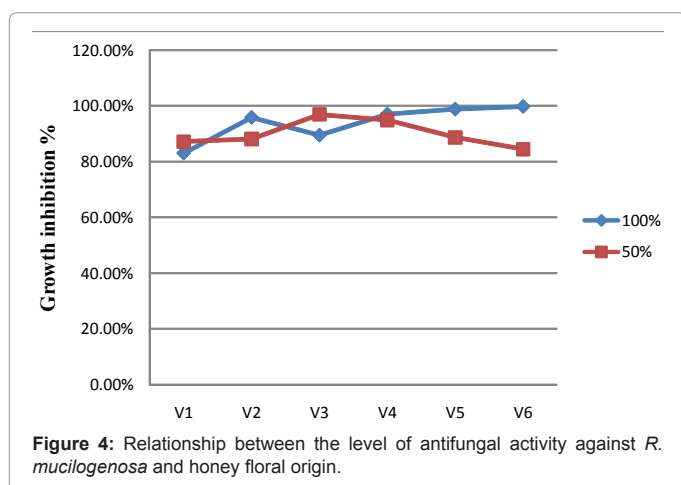


Figure 4: Relationship between the level of antifungal activity against *R. mucilaginosa* and honey floral origin.

drugs, as well as an increase in the incidence of azole-resistant strains [37]. Therefore, the search for new antifungal agents is necessary and stimulates research on new chemotherapeutic agents in natural products. Different natural substances are responsible for antifungal action. Honey is a natural product that is used for its antifungal activity

[14]. A number of studies have reported the antifungal properties of different types of honey. For example, Koc et al. [38] reported antifungal efficacy of various honeys, against clinical isolates of *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *Trichosporon spp* (Figure 3). Moussa et al. [12] found that honey concentration ranging from 50% to 100%, inhibited the growth of several pathogenic microorganisms, including *C. albicans* and *Rhodotorula sp*. Nevertheless, there is no information on antifungal activity of Algeria honey against *Rhodotorula mucilaginosa* in the literature (Figure 4). Additionally Obaseiki-Ebor et al. [39] demonstrated the susceptibility of 72 isolates of *C. albicans*, to honey. Khosravi et al. [40] reported that honey had antifungal activity against *Candida species* such as *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Candida kefyr*, *C. glabrata*, and *C. dubliniensis*.

Previous reports demonstrated that increased honey concentrations resulted in reduced growth of *C. albicans*, namely 29.4% inhibition on the growth was verified, in the presence of wasbessie honey at concentrations of 25% [41].

Several factors may influence the antifungal activity of honey. For example, DeMera and Angert [42] reported that honey from different phytoecographic regions, varied in their ability to inhibit the growth of yeasts, suggesting that botanical origin plays an important role in influencing the antifungal activity. In addition, there are a great variety of components, including phenolic acids, flavonoids and other biomolecules, in different honeys.

The variation in the antifungal potential of honey samples used in this study, as compared to the previous similar studies, highlights that the source of the nectars may have contributed to the difference in the antifungal activities of honey, i.e. the flowers from which bees gathered nectar to produce the honey, since flora source determines many of the attributes of honey, for example, flavor, aroma, color and composition.

References

- Molan PC (2002) Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers: theory and practice. *Ostomy Wound Manage* 48: 28-40.
- Molan PC (1998) The limitations of the methods of identifying the floral source of honeys. *Bee World* 97: 59-68.
- Ramírez-Arriaga E, Navarro-Calvo LA, Díaz-Carbajal E (2011) Botanical characterisation of Mexican honeys from a subtropical region (Oaxaca) based on pollen analysis. *Grana* 50: 40-54.
- Molan PC (1997) Honey as an antimicrobial agent. *Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy*. Plenum Press, New York.
- Molan PC (1992) The antibacterial activity of honey 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 5-28.
- Bogdanov S (2002) Harmonized Methods of the European Honey Commission. International Honey Commission.
- Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T (2008) Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res* 52: 483-489.
- Adams CJ, Boulton CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MN, et al. (2008) Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 343: 651-659.
- Krauze A, Zalewski RI (1991) Classification of honeys by principal component analysis on the basis of chemical and physical parameters. *Chemistry and Materials Science* 192: 19-23.
- Ahmed M, Aissat S, Djebli N, Boulkaboul A, Abdelmalek M, et al. (2011) The Influence of Starch of Ginger on the Antibacterial Activity of Honey of Different Types from Algeria against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *IJMR* 2: 258-262.
- Ahmed M, Djebli N, Hammoudi SM, Aissat S, Akila B, et al. (2012) Additive

- potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. Asian Pac J Trop Biomed 2: 253-255.
12. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Meslem A, Benhalima A (2012) Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula sp.* Asian Pac J Trop Biomed 2: 554-557.
 13. Ahmed M, Djebli N, Meslem A, Saad A (2012) Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram-Negative Bacilli: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2: 211-214.
 14. Ahmed M, Djebli N, Saad A, Meslem A (2012) Anti-Aspergillus niger of eucalyptus honey influenced by thermal treatment. Scientificreports1: 2.
 15. Erdtman G (1969) Handbook of Palynology. Munksgaard, Copenhagen.
 16. Chataway HD (1932) Determination of moisture in honey. Canadian Journal of Research 6: 532-547.
 17. AOAC (1990) Official methods of analysis. (15th edn), Association of official Analytical Chemists, Inc Arlington, VA, USA.
 18. Mateo R, Bosch-Reig F (1997) Sugar profiles of Spanish unifloral honeys. Food Chem 60: 33-41.
 19. Sancho MT, Muniategui S, Huidobro JF, Simal J (1992) Evaluating soluble and insoluble ash, alkalinity of soluble and insoluble ash and total alkalinity of ash in honey using electrical conductivity measurements at 20°C. Apidologie 23: 291-297.
 20. Zander E (1950) The service palynology study of honey. Annals Spanish Institute Soil Science 9: 195-209.
 21. The Council of the European Union (2002) Council Directive 2001/ 110/ EC of 20 December 2001 relating to honey. Official Journal of the European Communities 1: 47-52.
 22. Chakir A, Abderrahmane R, Gian LM, Paola F (2011) Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. Arabian Journal of Chemistry.
 23. Terrab A, Gustavo González A, Díez MJ, Heredia FJ (2003) Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. Eur Food Res Technol 218: 88-95.
 24. Finola MS, Lasagno MC, Marioli JM (2007) Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. Food Chemistry 100: 1649-1653.
 25. Singh N, Bath PK (1997) Quality evaluation of different types of Indian honey. Food Chem 58: 129-133.
 26. Azeredo LDC, Azeredo M, De Souza SR, Dutra VML (2003) Protein content and physicochemical properties in honey samples of *Apis Mellifera* of different floral origins. Food Chemistry 80: 249-254.
 27. Kayacier A, Karaman S (2008) Rheological and some physicochemical characteristics of selected Turkish honeys. Journal of Texture Studies 39: 17-27.
 28. Ouchemoukh S, Louaileche H, Schweizer P (2007) Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honey. Food Control 18: 52-58.
 29. Terrab A, Recamales AF, Hernanz D, Heredia FJ (2004) Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. Food Chem 88: 537-542.
 30. Al-Khalifa AS, Al-Arif IA (1999) Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. Food Chemistry 67: 21-25.
 31. Sahinler N, Gul A (2004) Highland and biochemical analysis of sunflower honey i. 4. National Animal Science Congress, Isparta, Turkey.
 32. Sudhanshu S, Satyendra G, Arun S (2010) Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. Food Chem 118: 391-397.
 33. Bogdanov S (2010) Physical Properties of Honey. Bee Product Science.
 34. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, et al. (2004) Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Res 4: 369-376.
 35. Cornet M, Fleury L, Maslo C, Bernard JF, Brücker G, et al. (2002) Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. J Hosp Infect 51: 288-296.
 36. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, et al. (2007) Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol 45: 1735-1745.
 37. Canuto MM, Rodero FG (2002) Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. Lancet Infect Dis 2: 550-563.
 38. Koc AN, Silici S, Kasap F, Hörmet-Oz HT, Mavus-Buldu H (2008) Antifungal activity of Turkish honey against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. an in vitro evaluation. Med Mycol 47: 707-712.
 39. Obaseki-Ebor EE, Afonya TC (1984) *In-vitro* evaluation of the anticandidiasis activity of honey distillate (HY-1) compared with that of some antimycotic agents. J Pharm Pharmacol 36: 283-284.
 40. Rhosravi A, Shokri H, Katirae F, Ziglari T, Forsi M (2008) Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. J Apicult Res 47: 256-260.
 41. Theunissen F, Grobler S, Gedalia I (2001) The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. Apidologie 32: 371-379.
 42. DeMera JH, Angert ER (2004) Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. Apidologie 35: 411-417.

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 200 Open Access Journals
- 15,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: www.editorialmanager.com/

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.



ISSN: 2161-0401

Organic Chemistry: Current Research

The International Open Access
Organic Chemistry: Current Research

Editor-in-Chief

Andes Hess

Vanderbilt University, USA

Executive Editors

Kazuhiro Chiba

Tokyo University of Agriculture and Technology
Tokyo, Japan

Kyungsoo Oh

Indiana University-Purdue University Indianapolis, USA

Hong Liu

Chinese Academy of Sciences, China

Available online at: OMICS Publishing Group (www.omicsonline.org)

This article was originally published in a journal by OMICS Publishing Group, and the attached copy is provided by OMICS Publishing Group for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for commercial/research/educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are requested to cite properly.

Digital Object Identifier: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0401.1000111>

The Relationship between Fructose, Glucose and Maltose Content with Diastase Number and Anti-Pseudomonal Activity of Natural Honey Combined with Potato Starch

Ahmed Moussa^{1*}, Djebli Nouredine², Aissat Saad¹ and Salima Douichene²

¹Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun, Tiaret, Algeria

²Departments of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria

Abstract

Honey whose medicinal uses date from ancient times has been lately rediscovered as therapy for burns.

Objective: To evaluate the additive action of potato starch on the antipseudomonal activity of natural honey.

Methods: Physicochemical parameters of 6 samples of Algerian honeys were analysed; four parameters were measured, including Diastase, glucose, fructose and maltose. The antibacterial activity was tested using the well-agar diffusion assay.

Results: Six honey samples with initial diastase activity between 22.1 and 7.3 Schade units were tested. Glucose, fructose and maltose values range between 21, 45-30, 95%, 25, 20-37, 81% and 4, 72-78, 45% respectively. The zone inhibition diameter (ZID) for the six honey samples without starch against *P. aureogenosa* ranged between 26 and 31 mm. When starch was mixed with honey and then added to well, a zone inhibition increase diameter (ZIID) 27 and 32 mm. The percentage increase (PI %) was noticed with each variety and it ranged between 3, 57 and 18, 75%. Positive correlation has been established between the zone increase of inhibition and the Diastase number (r value was 0.072 at $p < 0.05$).

Conclusion: The use of potato starch allows honey benefit and would constitute an additive effect to the antibacterial activity of natural honey.

Keywords: Diastase number; Honey; Antibacterial activity; Potato starch

Introduction

Many burn infections are treated with antibiotics that can be applied topically or administered orally or by injection. Unfortunately, due to the excessive use of antibiotics, some bacteria have evolved to become antibiotic resistant, and this has led to the present time being described as the “end of the antibiotic era” [1,2]. The dominant flora of burn wounds during hospitalization changes from Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus* to Gram-negative bacteria like *Pseudomonas aeruginosa*. The majority of *P. aeruginosa*, an opportunistic human pathogen, isolates from burn patients were multidrug resistant (MDR) [3-5]. In wounds, *P. aeruginosa* has emerged as a multidrug-resistant organism that gives rise to persistent infections in burns patients [6,7] and chronic venous leg ulcers [8]. Novel antimicrobial interventions are needed.

The complexity of natural products, including honey, makes them very difficult to standardize and this can affect their acceptance in clinical medicine. However, this complexity also has benefits. Unlike conventional antibiotics it appears to be difficult for microorganisms to become resistant to the effects of honey, probably due to the action of the various active components in honey on multiple microbial targets [9]. Honey is the most famous rediscovered remedy that has been used to promote wound and burn healing and also to treat infected wounds [10]. The use of honey in modern clinical practice is based on its broad antimicrobial properties and its ability to stimulate rapid wound healing.

Several bioactive compounds have been identified in honey which contributed to its antibacterial action. The commonly accepted list of contributors includes osmolarity [11]. High osmolarity has been considered a valuable tool in the treatment of infections, because it

prevents the growth of bacteria and encourages healing [12]. Honey is a supersaturated sugar solution; and sugar content accounts for more than 95% of the dry matter. Honey is an extremely varying and complex mixture of sugars and other minor components. Fructose is the most dominant sugar followed by glucose in almost all types of honey [13]. Maltose content in natural honey is generally less than 30 mg/g [14,15]. Maltose in some honeys originating from certain plants can be up to 50 mg/g [16,17].

Honey contains small amounts of different enzymes, notably, diastase (α - and β -amylase), invertase (α -glucosidase), glucose-oxidase, catalase and acid phosphatase, which come from nectar sources, salivary fluids and the pharyngeal gland secretions of the honeybee [18]. A diastase is any one of a group of enzymes that catalyze the breakdown of starch into maltose [19]. Alpha amylase degrades starch to a mixture of the disaccharide maltose, the trisaccharide maltotriose and oligosaccharides known as dextrin's [20]. Diastase activity is expressed as the diastase number (DN) in Schade units and is defined as follows: one diastase unit corresponds to the enzyme activity of 1 g of honey,

*Corresponding author: Ahmed Moussa, Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun, Tiaret, Algeria, Tel: +213 65234059; Fax: 213 65234059; E-mail: moussa7014@yahoo.fr

Received October 09, 2012; Accepted October 26, 2012; Published October 31, 2012

Citation: Moussa A, Nouredine D, Saad A, Douichene S (2012) The Relationship between Fructose, Glucose and Maltose Content with Diastase Number and Anti-Pseudomonal Activity of Natural Honey Combined with Potato Starch. Organic Chem Curr Res 1:111. doi:10.4172/2161-0401.1000111

Copyright: © 2012 Moussa A, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

which can hydrolyse 0.01 g of starch in 1 h at 40°C. The range permitted for diastase number varies from 3 to 8 on Gothe's scale, depending on the climate prevailing in the place where the honey originates [21]. In previous studies, we have shown that there is an Additive action between honey and ginger starch in terms of antibacterial [22] and antifungal activity [23,24]. We suggested that α amylases present in honey originating from bees and pollen are responsible in the hydrolysis of starch chains to randomly produce dextrin and maltose that increase the osmotic effect of honey and consequently increase the antibacterial activity. But no starch is found in honey. The aim of this study is to evaluate the potential antibacterial activity of honey and potato starch when used jointly to manage superficial burn.

Materials and Methods

Preparation of honey sample

Six unifloral and multifloral honey samples were collected from beekeepers in different regions of the western Algeria during different seasons of the 2011 year depending on floral sources: Jujube, Citrus, Eucalyptus and Multifloral. All samples were collected in their original packages and were transferred to the laboratory and kept at 4-5°C until analysis. Honey was used within a few hours of preparation to avoid self-decomposition and decrease in diastase activity.

Preparation of the stock starch solution

The stock starch solution was prepared by dissolving 0.5 g of dried soluble starch in deionised water in a volumetric flask. After heating and stirring the solution for approximately ten minutes, starch was completely dissolved, and the volumetric flask was filled with deionised water to the mark.

Physicochemical analyses

All physicochemical tests were performed in triplicate.

Determination of maltose, glucose and fructose contents

Sugar spectra (fructose, glucose, and maltose) were identified and determined by Bogdanov [25] for di- and oligosaccharides using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Diastase activity (Diastase number)

Diastase activity was measured with Phadebas, according to the Harmonized Methods of the European Commission of Honey [25]. An insoluble blue dyed cross-linked type of starch is used as the substrate. This is hydrolysed by the enzyme, yielding blue water-soluble fragments, determined photometrically at 620 nm. The absorbance of the solution is directly proportional to the diastatic activity of the sample. The diastase activity, expressed as DN or diastase number, was calculated from the absorbance measurements using Eqs. (1) and (2)

for high (8–40 diastase units) and low (up to 8 diastase units) activity values, respectively:

$$DN = 28.2 \times \Delta A_{620} - 2.64 \quad (1)$$

$$DN = 35.2 \times \Delta A_{620} - 0.46 \quad (2)$$

Bacterial culture and inoculum preparation

Pure culture of *P. aeruginosa* ATCC 27853 was obtained from the Department of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria. The bacteria was grown on Nutrient Agar (NA; Merck Germany) slant, incubated at 37°C for 24 h, and kept at 4°C until further use. Bacterial suspension was prepared by inoculating one loopful of the 24-h-old bacterial colonies into 10.0 ml of sterilized distilled water. The inoculums size was adjusted to match the turbidity of McFarland 0.5 scale (1×10^8 cells/ml) and diluted with sterilized distilled water to the inoculums size of 1×10^7 cells/ml.

Measurement of zone of inhibition (Well diffusion assay)

A screening assay using well diffusion [26] was carried out with some minor modifications. Nutrient agar plates (Merck, Germany) were inoculated by rubbing sterile cotton swabs that were dipped into bacterial suspensions (over night) cultures grown at 37°C on nutrient agar and adjusted to 0.5 McFarland in sterile saline) over the entire surface of the plate. After inoculation 8.2 mm diameter wells were cut into the surface of the agar using a sterile cork borer. 50 μ l of test honey was added to each well. Plates were incubated at 30°C for 24 h. A diffusion control of starch was used. Second step a mixture of starch-honey was prepared and incubated for one hour at 40°C. After inoculation 8.2 mm diameter wells were cut into the surface of the agar using a sterile cork borer. 50 μ l of mixture (honey and starch) were added to each well. Zones of inhibition were measured using a Vernier caliper. The diameter of zones, including the diameter of the well, was recorded. Bioassay was performed in duplicate and repeated twice. The results were expressed in terms of the diameter of the inhibition zones: <5.5 mm, inactive; 5.5-9 mm, very low activity; 9-12 mm, low activity; 12-15 mm, average activity; and >15 mm, high activity.

Statistical analysis

Each honey was analyzed in triplicate. Results are shown as mean values and standard deviation. Correlations were established using Pearson's correlation coefficient (r) in bivariate linear correlations ($p < 0.01$). All statistical analyses were performed with the Statistica 7.0 software for Windows.

Results and Discussion

Physicochemical parameters

Table 1 reports the physico-chemical parameters of the honey

Honey samples	glucose (g/100 g honey)		fructose (g/100 g honey)		maltose (g/100 g honey)		Sugar total content (%)		Diastase activity (Schade Number ^b)	
	Mean	DS	Mean	DS	Mean	DS	Mean	DS	Mean	DS
H1	21.45	2.14	25.20	3.32	0.00	1.32	46.65	2.26	15.1	2.8
H2	26.18	2.14	37.81	3.32	7.13	1.32	71.12	2.26	23.5	2.8
H3	25.78	2.14	33.92	3.32	8.45	1.32	68.45	2.26	11	2.8
H4	28.84	2.14	36.84	3.32	7.01	1.32	72.69	2.26	26	2.8
H5	27.24	2.14	35.41	3.32	4.72	1.32	67.37	2.26	7.3	2.8
H6	30.95	2.14	35.18	3.32	7.10	1.32	73.23	2.26	16.4	2.8

^bSchade number. corresponds with Gothe number, or 0.01 g starch hydrolysed 1h at 40°C per 1 g honey.

Table 1: The concentration of glucose, fructose and maltose in the honey samples (g/ 100 g) and diastase activity results represent the average of four measurements \pm SD (n=3).

samples. The mean, standard deviation (SD) and the variable ranges are reported for comparison with international standards. Fructose, glucose and maltose values range between 25, 20-37, 81%, 21, 45-30, 95% and 4, 72-78, 45%, respectively.

Analysis of amylase activity

The diastatic activity in honey is considered a quality factor. It decreases during storage, heat treatment and feeding of honeybees during honey flow; thus, it is an indicator of honey ageing, adulteration and overheating. The honey samples analyzed in the present work show a range of values, between 22.1 and 7.3 Schade units. One sample (H5) show values below 8 Schade units (Table 1). The explanation for the low content of diastatic activity found in this one sample could be accounted for an inadequate processing or storage conditions.

Antibacterial activity

The six honey samples were studied in terms of antibacterial activity were performed in duplicate. (Table 2) and (Figures 1 and 2) summarize the zones of inhibition of the honey samples against the tested organism. The differences in inhibition were observed for six types of honey sample (H5) has the largest inhibition with an average diameter of 31 mm, followed by the sample (H6) in (30 mm), H4 (29 mm), H2 (28 mm), H3 (27 mm), and finally the sample H1 (26 mm). No zone of inhibition was determined with starch alone.

The differences in inhibition were observed for six types of honey

Honeysample	Honey only	Starch and honey % (v/v)	Zone increase of inhibition Percentage increase (PI%)
H1	26	32	18.75
H2	28	28	3.57
H3	27	27	3.57
H4	29	30	3.57
H5	31	31	00
H6	30	30	00

<5.5 mm. inactive; 5.5–9 mm. very low activity; 9–12 mm. low activity; 12–15 mm. average activity; and >15 mm, high activity

Table 2: Mean Zones of Inhibition (diameter mm including well (8.2 mm).

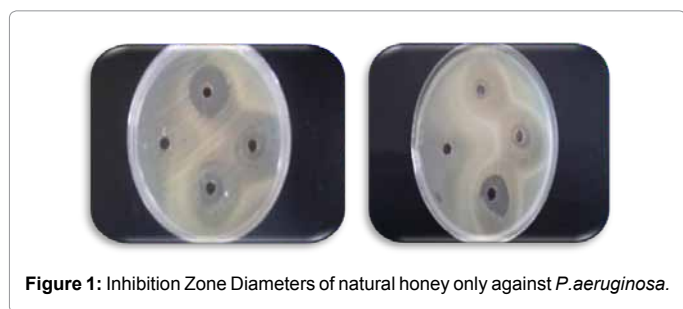


Figure 1: Inhibition Zone Diameters of natural honey only against *P. aeruginosa*.

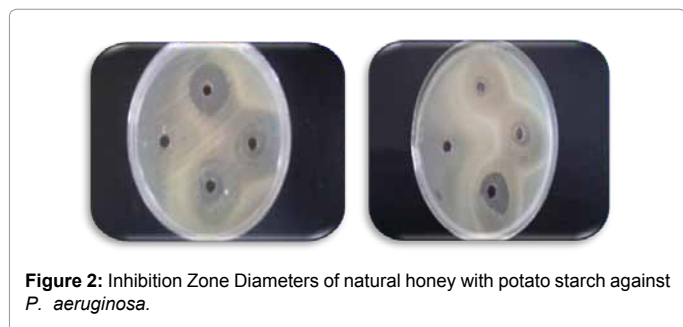


Figure 2: Inhibition Zone Diameters of natural honey with potato starch against *P. aeruginosa*.

with starch potato: the sample (H5) has the largest inhibition with an average diameter of 31 mm, followed by the sample (H1) in (31 mm), H5 (31 mm), H4 and H6) (30 mm), H2 (28 mm) and finally the sample H3 (27 mm). The percentage increase (PI%) was noticed with each variety and it ranged between 3, 57 and 18, 75%.

Pseudomonas aeruginosa is the predominant cause of fatal burn wound sepsis, and isolation of multidrug-resistant strains is a common problem in hospitals. With increasing interest in the use of alternative therapies and as the development of antibiotic resistant bacteria spreads. Many works was interested, during this last decade, with the products of the hive and in particular honey, efficient product against the germs secreted by the bees as a possible source of new pharmaceutical and medical agent. In Algeria, there are few types of alternative medicine such as honey. Recent experimental finding indicated that the amylase present in honey increases the osmotic effect in the media by increasing the amount of sugars and consequently increasing the antibacterial activity [22]. High osmolarity has been considered a valuable tool in the treatment of infections, because it prevents the growth of bacteria and encourages healing [27]. Use of sugar to enhance wound healing has been reported for several hundred patients [28].

Molan [29] has studied sugar syrups of the same water activity as honey and found them to be less effective than honey at inhibiting microbial growth *in vitro*. It was found that solutions of high osmolarity, such as honey, glucose, and sugar pastes, inhibit microbial growth because the sugar molecules tie up water molecules so that bacteria have insufficient water to grow [30]. Therefore, high osmolarity is valuable in the treatment of infections because it prevents the growth of bacteria and encourages healing. Sugar was used to enhance wound healing for several hundred patients [31]. It has been claimed that the sugar content of honey is responsible for its antibacterial activity, which is due entirely to the osmotic effect of its high sugar content [32].

In our study, the addition of starch potato honey showed a significant increase in the inhibition zone for honey studied against the strain tested except honey H5 and H6. Amylase present in honey was expected to split potato starch chains into randomly produced dextrin and maltose and probably increases the osmotic effect in the well by increasing the amount of sugar and consequently increases the antibacterial activity. Other results show that the addition ginger starch to honey could contribute to reducing the quantity of honey to be used without losing the expected effect [22-24]. In our study, the amount of the amylase present in honey is in positive correlation with the relative potency of starch and honey.

Neither honey nor starch has adverse effects on tissues, so they can be safely used in wounds, burns and inserted in cavities and sinuses to clear infection. A clinical trial would be carried out to validate these findings. The results will enable a systematic study of many varieties of honey on pathogens bacteria within increased resistance opposite conventional antibiotics.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgement

Authors thank Staff of Tiaret University for providing material.

References

1. Siegenthaler U (1975) Bestimmung der Amylase in Bienenhonig mit einem handelsüblichen, farbmarkierten Substrat. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 66: 393-399.
2. Bogdanov S (1984) Honigdiastase, Gegenüberstellung verschiedener Bestimmungsmethoden. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg* 75: 214-220.

3. Rastegar Lari A, Bahrami Honar H, Alaghebandan R (1998) Pseudomonas infections in Tohid Burn Center Iran. *Burns* 24: 637-641.
4. Sharma BR (2007) Infection in patients with severe burns: causes and prevention thereof. *Infect Dis Clin North Am* 21: 745-759.
5. Lari AR, Alaghebandan R (2000) Nosocomial infections in an Iranian burn care center. *Burns* 26: 737-740.
6. Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP, et al. (2009) Emerging infections in burns. *Surg Infect* 10: 389-397.
7. Keen EF 3rd, Robinson BJ, Hospenthal DR, Aldous WK, Wolf SE, et al. (2010) Prevalence of multidrug resistant organisms recovered at a military burn center. *Burns* 36: 819-825.
8. Jacobsen JN, Andersen AS, Sonnedst MK, Laursen I, Jorgensen B, et al. (2011) Investigating the humoral immune response in chronic venous leg ulcer patients colonised with *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Wound J* 8: 33-43.
9. Blair SE, Cokcetin NN, Harry EJ, Carter DA (2009) The unusual antibacterial activity of medical -grade Leptospermum honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 1199-1208.
10. Molan PC (2001) Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am J Clin Dermatol* 2: 13-19.
11. Bose B (1982) Honey or Sugar in Treatment of Infected Wounds? *Lancet* 1: 963.
12. Archer HG, Barnett S, Irving S, Middleton KR, Seal DV (1990) A controlled model of moist wound healing: comparison between semi-permeable film, antiseptics and sugar paste. *J Exp Pathol* 71: 155-170.
13. Wang J, Li QX (2011) Chemical composition, characterization and differentiation of honey botanical and geographical origins. *Adv Food Nutr Res* 62: 89-137.
14. Cotte JF, Casabianca H, Chardon S, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF (2003) Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *J Chromatogr A* 1021: 145-155.
15. Joshi SR, Pechhacker H, Willam W, von der Ohe W (2000) Physico-chemical characteristics of *Apis dorsata*, *A. cerana* and *A. mellifera* honey from Chitwan district, central Nepal. *Apidologie* 31: 367-375.
16. Costa LSM, Albuquerque MLS, Trugo LC, Quinteiro LMC, Barth OM, et al. (1999) Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chem* 65: 347-352.
17. Devillers J, Morlot M, Pham-Delegue MH, Dore JC (2004) Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chem* 86: 305-312.
18. Huidobro JF, Santana FJ, Sanchez MP, Sancho MT, Muniategui S, et al. (1995) Diastase, invertase and α -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. *J Apic Res* 34: 39-44.
19. Crane Honey E (1975) A Comprehensive Survey, International Bee Research Association, Heinemann, London, UK
20. Sakac N, Sak-Bosnar M (2012) A rapid method for the determination of honey diastase activity. *Talanta* 93: 135-138.
21. Tosi E, Martinet R, Ortega M, Lucero H, Re E (2008) Honey diastase activity modified by heating. *Food Chem* 106: 883-887.
22. Ahmed M, Aissat S, Djebli N, Boulkabout A, Abdelmalek M, et al. (2011) The Influence of Starch of Ginger on the Antibacterial Activity of Honey of Different Types from Algeria against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *I J M R* 2: 258-262.
23. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Aggad H, Boucif Ahmed (2011) Antifungal Activity of a Combination of Algeria Honey and Starch of Ginger against *Aspergillus niger*. *I J M R* 2: 263-266.
24. Ahmed M, Djebli N, Hammoudi SM, Aissat S, Akila B, et al. (2012) Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. *Asian Pac trop Biomed* 2: 253-255.
25. Bodganov S, Martin P, Lüllmann C (1997) Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*.
26. Al Somal N, Coley KE, Molan PC, Hancock BM (1994) Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *J R Soc Med* 87: 9-12.
27. Archer HG, Barnett S, Irving S, Middleton KR, Seal DV (1990) A controlled model of moist wound healing: comparison between semipermeable film, antiseptics and sugar paste. *J Exp Pathol* 71: 155-170.
28. Knutson RA, Merbitz LA, Creekmore MA, Snipes HG (1981) Use of sugar and povidone-iodine to enhance wound healing: five year's experience. *South Med J* 74: 1329-1335.
29. Molan PC (1992) The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 5-28.
30. Chirife J, Scarmato G, Herszaqe L (1982) Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. *Lancet* 1: 560-561.
31. Green A (1988) Wound healing properties of honey. *Br J Surg* 75: 1278.
32. Somerfield S (1991) Honey and healing. *J R Soc Med* 84: 179.

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 200 Open Access Journals
- 15,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscripts as E-mail: editor.organicchemistry@omicsonline.org



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.



Open Access
Scientific Reports

Open Access Scientific Reports

Your Research - Your Rights

Our Mission

Operation of Online Open access journals and organizing scientific and business events.

Our Vision

The Main Vision of OMICS Group is to make Healthcare and Scientific Information Open Access

Available online at: Open Access Scientific Reports
(<http://www.omicsonline.org/scientific-reports.php>)

This article was originally published in a journal by Open Access Scientific Reports, and the attached copy is provided by Open Access Scientific Reports for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for commercial/research/educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are requested to cite properly.

Anti-*Aspergillus niger* of Eucalyptus Honey Influenced by Thermal Treatment

Ahmed Moussa^{1*}, Djebli Nouredine², Aissat Saad¹ and Meslem Abdelmelek¹

¹Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun Tiaret, Algeria

²Departments of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of heat processing on the antifungal activity of honey against *Aspergillus niger*. A sample of eucalyptus honey was divided into four portions of 250 g each. One of the four honey portions was not heated (Room temperature: 25°C). The other portions were placed in water bath during 24 hours at 40°C, 60°C and 80°C temperatures. The HMF rates, Acidity, pH and the refraction index were determined by harmonized methods. The antifungal tests (Minimum Inhibitory Concentration) were carried out on Sabouraud agar medium embedded with honey according to dilution test. The moisture shows values of 15.65% and 15.83%, pH between 4.10 and 4.24, the free acidity ranges between 33.8 and 38.36 meq kg⁻¹, Hydroxymethylfurfural (HMF) content shows values between 28.8 and 103.44 mg kg⁻¹.

The antifungal action of the non-heated fraction (Fc) of honey *in vitro* was marked 46 % (vol/vol) than heated fractions of honey (47%, 48%, and 50%) vol/vol. respectively the antifungal activity of each fraction decreased in the following order: 46% (F25°C), 47% (F40°C), 48% (F60°C) and 50% (F80°C). Our findings indicate that different levels of parameters physical-chemical properties of honey to different temperatures showed inhibitory activity against *A. niger* with variable degrees but heating honey diminish its antifungal capacity.

Keywords: Honey; *Aspergillus niger*; Antifungal activity; Thermal treatment

Introduction

Therapeutic limitations, development of fungal drug resistance, drug-related toxicity, drug interactions and insufficient bioavailability of the currently available antifungal drugs have made the development of drugs necessary that would be able to treat the emerging fungal infections [1]. Honey forms part of traditional medicine in many cultures [2], although it is most widely used as sweetener. It is composed of at least 181 components and is basically a solution supersaturated in sugars, fructose (38%) and glucose (31%) are the most important [3], the moisture content is about 17.7%, total acidity 0.08%, and ashes constitute 0.18% [4]. In addition, there is a great variety of minor components, including phenolic acids and flavonoids, the enzymes glucose oxidase and catalase, ascorbic acid, carotenoids, organic acids, amino acids, proteins, and α -tocopherol [5].

Acidity and pH of honey are mainly due to the content of the gluconolactone/gluconic acid present as result of the enzymatic action of glucose-oxidase [6]. Honey moisture content is a quality criterion that determines its shelf-life during storage because of resistance to spoilage by yeast fermentation. Differences on moisture content also depend on the harvest season and the degree of maturity reached in the hive [7].

Hydroxymethylfurfural (HMF) content is one of the most important quality parameters of the quality and health safety of honey. This cyclic aldehyde develops in honey either by hexose dehydration (glucose and fructose) in acidic environment or as a result of Maillard's reaction. HMF content in fresh honey is very low or nonexistent, its concentration increases in the course of storing (in relation to pH, the length of storing) and also in the course of the honey heating [8].

Several types of honey are produced in Algeria, where honey production is a traditional practice, well implanted in several regions. The Tiaret region is located in the west of Algeria, where, due to its edaphoclimatic conditions and flora diversity, *Hedysarum coronarium*,

Eucalyptus camaldulensis and *E. globuluss*, *Pimpinella anisum*, and *Trifolium alexandrinum* are the principal honey types produced, being Eucalyptus honey the most important unifloral one.

The aim of the present work was to detect which level of physico-chemical parameter values Anti-*Aspergillus niger* of eucalyptus are honey influenced by thermal treatment

Materials and Methods

Heating treatment

A sample of eucalyptus honey was divided into four portions of 250 g each. One of the four portions was no heated (room temperature: 25°C), the other portions were placed in a water bath for 24 hours at 40°C, 60°C, 80°C. The four fractions of honey were examined immediately after heating for their moisture content, pH, free acidity, HMF and antifungal Activity. All experiments were conducted in duplicate.

Determination of moisture, pH, free acidity and HMF contents in honey

Physico-chemical parameters were analysed using The Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists [10] and The Harmonised Methods of the European Honey Commission [11]. Samples were analyzed during the same time period to ensure

***Corresponding author:** Dr. Ahmed Moussa, Institute of Veterinary Sciences, University Ibn-Khaldoun Tiaret (14000), Algeria, Tel: +213 65234059; Fax: +213 46 425001; E-mail: moussa7014@yahoo.fr

Received April 19, 2012; Published July 30, 2012

Citation: Moussa A, Nouredine D, Saad A, Abdelmelek M (2012) Anti-*Aspergillus niger* of eucalyptus honey influenced by thermal treatment. 1: 175. doi:10.4172/scientificreports.175

Copyright: © 2012 Moussa A, et al., This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

uniform conditions and comparability. pH was measured by means of a potentiometric pH meter (CG822 SGH) in a solution containing 10 g of honey in 75 ml of CO₂ free distilled water [10].

The moisture content was determined based on the refractometric method. In general, the refractive index increases with the increase in the solid content. The refractive indices of honey samples were measured at ambient temperature using an Atago hand refractometer and the readings were further corrected for a standard temperature of 20°C by adding the correction factor of 0.00023/°C. Moisture content was determined in triplicate and the% moisture content values corresponding to the corrected refractive index values were calculated using Wedmore's table [10].

Free acidity was determined as follows by the titrimetric method: 10 g honey samples were dissolved in 75 mL of CO₂-free water in a 250 mL beaker. The electrode of the pH meter was immersed in the solution, stirred with a magnetic stirrer and tritated to pH 8.5 by adding 0.05 N NaOH solution [10].

Hydroxymethyl furfural (HMF) was detected using a technique based on the method described by Winkler [12]. Five grams of honey were dissolved, without heating, in oxygen free distilled water and transferred to a 125 ml graduated flask and diluted to volume with oxygen free distilled water. Two millilitres of honey solution was pipetted into two tubes and 5 ml of P-toluidine solution was added to each. Into one test tube, 1 ml of water was pipetted and into the other 1 ml of barbituric acid solution was added; both mixtures were then shaken. Absorbance was read using a spectrophotometer against a blank at a wave length of 550 nm. Calculation: Mg/100 g hydroxymethyl furfural = absorbance/test x 192 [13].

Preparation of inoculum suspension

Aspergillus niger was kindly provided by the (Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun Tiaret, Algeria). Strains were maintained by subculture in specific media (SDA: Sabourad dextrose agar). Stock suspensions of *A. niger* were prepared from sporulating 7-day-old cultures grown on SDA at 28°C. Colonies were covered with 5 ml sterile distilled water and the surface scraped with a sterile loop. The mixture of conidia and hyphal fragments was filtered through an 8 mm sterile filter and collected in a sterile tube. This procedure removed the majority of the hyphae, producing inocula composed mainly of spores [13-15]. Turbidity of the final inocula was adjusted to 0.5 x 10⁶–5.0 x 10⁶ spores ml⁻¹, at a wavelength of 520 nm, and transmission adjusted to 70% in a spectrophotometer.

Minimum Inhibitory Concentration measurement (MIC)

Increased concentrations of honey (10-50 % vol/vol) were incorporated into media to test their efficiency against *A.niger*. Each plate with final volume of honey and media of 5 ml was inoculated and incubated at 37°C for 5 days. The MIC was determined by finding the plates with the lowest concentration of honey on which the strain would not grow. All MIC values are expressed in % (vol/vol) were added to a range of honey concentrations lower than the MIC.

Results

The pH of the honey samples varied from 4.10 to 4.24 (Table 1). These values were within the pH range of 3.81–6.32 reported by [16,17]. The pH values of honey are of great importance during extraction and storage, since acidity can influence the texture, stability, and shelf life of honey [18].

All the moisture values were under the allowed limit of 21% moisture content permitted by FSANZ [19]. The moisture content of the studied honey samples ranged from 15.65% to 15.83% (Table 1).

The moisture level of the analyzed fractions was consistent with the previous reported values for some Algerian honeys for which the corresponding values ranged from 18.7% to 21.8% [20] In Codex Alimentarius [21]) and EU [22]. Council directives the maximum M content value of pure floral honey is given as 23% for heather honeys and not more than 20% in general. The water content of honey depends on various factors, for example: the harvesting season, the degree of maturity reached in the hive, and environmental factors [23]. Furthermore, the water content value is also of great importance because it is considered to be a useful parameter for describing moistness and viscosity of honey.

Free acidity of all four samples fell within the permitted range proposed by [21] of no more than 50 milliequiv acid/kg. The free acidity of honey samples in this study ranged from 33.08 to 38.36 meq kg⁻¹ respectively (Table 1). High free acidity values may indicate the fermentation of honey sugar by yeasts. It is well known that during fermentation, glucose and fructose are converted into carbon dioxide and alcohol. Alcohol is further hydrolysed in the presence of oxygen and converted to acetic acid, which contributes to the level of free acidity in honey.

The HMF content is widely recognized as a parameter of honey samples freshness, because it is absent in fresh honeys and tends to increase during processing and/or aging of the product. Several factors influence the levels of HMF, such as temperature and time of heating, storage conditions, pH and floral source, thus it provides an indication of overheating and storage in poor conditions [24]. HMF shows values between 28.8 and 43.29 kg⁻¹, fractions 3 and 4 with values between 78.32 and 103.44 mg kg⁻¹ exceeded the limits set by European Community legislation [21] due to overheating.

The different level of value for the four fractions of honey showed antifungal activity against *A.niger* to varying degrees (Table 1).

HMF value of unheated honey (28.8 mg/kg) showed the highest inhibitory effect on yeast growth compared to heated fractions (Figure 3). Similarly, free acidity value of unheated honey (33.8 meq kg⁻¹) showed the highest inhibitory effect on mould growth compared to treated fractions by heat (Figure 2). Furthermore, pH value of honey 4.24 showed the highest inhibitory effect on yeast growth compared to heated fractions (Figure 1).

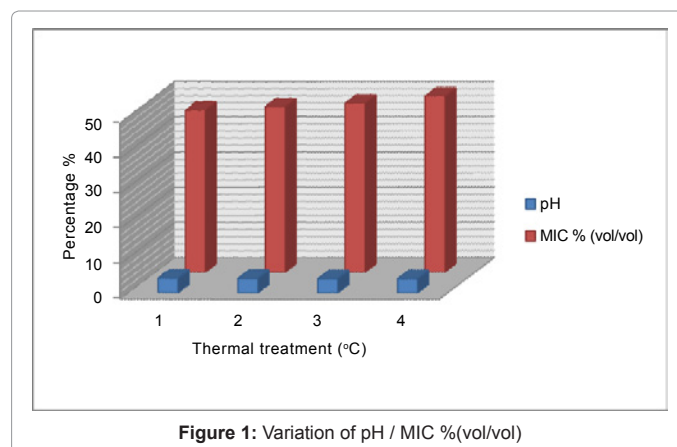


Figure 1: Variation of pH / MIC %(vol/vol)

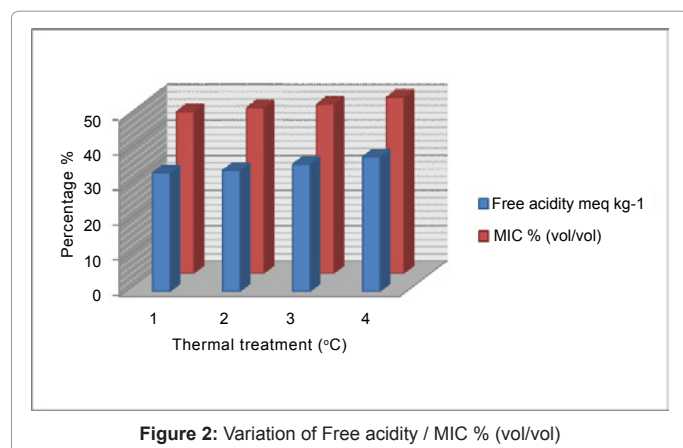


Figure 2: Variation of Free acidity / MIC % (vol/vol)

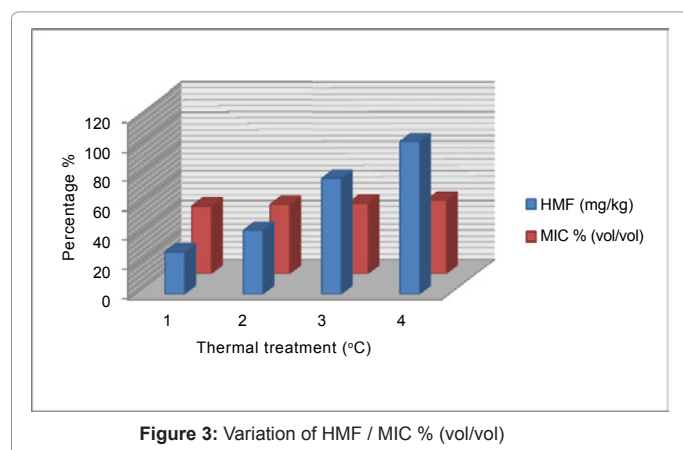


Figure 3: Variation of HMF / MIC % (vol/vol)

Discussion

Aspergillus niger could be implicated in ophthalmic and some coetaneous problems [25,26]. The resistance of *A. niger* to conventional antifungal is also a common problem [27,28]. Therefore, there is an urgent need for new antifungal agents for the efficient management of mould infections. Research on the active constituents of natural or traditional medicines, which are a potential source for new drugs, is drawing more attention. Honey has long been recognized for their antimicrobial activity against bacteria, molds and yeasts with unique properties that render it bacteriostatic and bactericidal. The high osmotic pressure, low water activity, low pH, low redox potential of honey, hydrogen peroxide and other phytochemical factors might contribute to the honey antimicrobial nature. Their relative importance depends on the sensitivity of the species and the level of additional factors in any honey [6,29].

Honey has been used since ancient times for the treatment of several diseases. Although several *in vitro* studies have demonstrated the antibacterial activity of honey [30], limited numbers of studies have examined the activity of honey against fungi.

Ahmed et al. [32] found that the MIC of four varieties of honey against *A. niger* ranged between 53 and 57% (vol/vol). According to Boukraa et al. [33], the minimum concentration of honey in Yeast Peptone Glucose Agar Media (YPGA) required to inhibit *A. niger* was 46% (vol/vol).

The inhibitory effect of honey on *A. niger* is not correlated with

Physicochemical parameters	Control not heated	Thermal treatment		
	25°C	40°C	60°C	80°C
pH	4.24	4.22	4.11	4.10
Moisture content %	15.83	15.83	15.65	15.65
Free acidity (meq kg ⁻¹)	33.8	34.49	36.25	38.36
HMF (mg/kg)	28.8	43.29	78.32	103.44
MIC % (vol/vol)	46	47	48	50

Table 1: Heat treatment, pH, Moistire, Free acidity and HMF and growth inhibition of *C. albicans* in different honey fractions.

the decrease in pH or the increase in free acidity as seen in table 1. In general, bacteria grow optimally in the pH range 6.0–8.0, yeasts 4.5–6.0 and filamentous fungi 3.5–4.0 [34]. Koc et al. [31] assessed the *in vitro* antifungal activity of four Turkish honey samples from different botanical origin against *Trichosporon spp.* and *Candida spp.* and concluded that multifloral honey had the highest antifungal activity and it probably contains the highest total phenolic content. According to Brudzynski and Miotto [35], heat-treatment resulted in about a two fold increase in phenolic content for all tested honeys (n =2 2) compared to the control. Hydrogen peroxide is known to have antimicrobial properties and much evidence exists to suggest that it is this compound which confers antimicrobial activity to honey [36–38]. Hydrogen peroxide at low concentration, far beneath, the apparent threshold of its biological activity, can affect the fungus development [39]. H₂O₂ produced by honey glucose oxidase is heat-sensitive (White) as our results showed a decrease in antifungal activity after heat treatment, it can be concluded that the antifungal activity was not due to the phenolic but to H₂O₂, or in a synergistic effect.

Collectively, our findings indicate that different levels of parameters physical-chemical properties of honey to different temperatures showed inhibitory activity against *A. niger* with variable degrees.

Acknowledgements

Authors thank Staff of Tiaret University for providing material.

References

- Melo e Silva F, de Paula JE, Espindola LS (2009) Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses* 52: 511–517
- Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Bio Anal* 41: 1220–1234.
- Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ (2002) Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem* 50: 5870–5877.
- Nagai T, Inoue R, Kanamori N, Suzuki N, Nagashima T (2006) Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chem* 97: 256–262.
- Ferreres F, Garcavioguera C, Tomaslorente F, Tomasbarberan FA (1993) Hesperetin C a marker of the floral origin of citrus honey. *J Sci Food Agric* 61: 121–123.
- Molan PC (1992) The antibacterial activity of honey: the nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 5–28.
- Corbella E, Cozzolino D (2006) Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. *Food Sci Tech* 39: 534–539.
- Klára B, Michaela D, Ivana Bo, Lenka V (2011) Impact of Microwave Heating on Hydroxymethylfurfural Content in Czech Honeys. *Czech J Food Sci* 29: 328–336.
- Bodganov S, Martin P, Lußmann C (1997) Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie* 1–59.

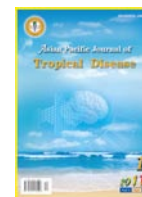
10. AOAC (1990) Official methods of analysis. In K Helrich (Ed.) (15th ed.). Arlington, VA, USA: Association of official Analytical Chemists, Inc.
11. Winkler C (1955) Beitrag Zur Nachweis und Zur Bestimmung Von Kunstthoning. Zeitschr. Lebensm. Unters. Forsch 102: 161-167.
12. Auerbach F, Borries G (1924) Auerbach and Borries equation. Z Nahr Genssm 22: 353-358.
13. Petrikou E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Goçmez A, Molleja A, et al. (2001) Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. J Clin Microbiol 39: 1345-1347.
14. Santos DA, Hamdan JS (2005) Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for Trichophyton rubrum. J Clin Microbiol 43: 1917-1920.
15. Santos DA, Barros MES, Hamdan JS (2006) Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes. J Clin Microbiol 44: 98-101.
16. Gerard D, Karen HJ, Daniel K, Thomas FW, Martin PG (2005) Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. Food Chem 91: 347-354.
17. Amina C, Abderrahmane R, Gian LM, Paola F (2011) Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. Arab J Chem.
18. Terrab A, Díez MJ, Heredia FJ (2003) Palynological, physicochemical and colour characterization of Moroccan honeys: III. Other unifloral honey types. Int J Food Sci Technol 38: 395-402.
19. Food Standard Australia New Zealand (FSANZ) (2006) Standard 2.8.2: Honey,update 2006. Accessed March 2012.
20. Singh N, Bath PK (1997) Quality evaluation of different types of Indian honey. Food Chem 58: 129-133.
21. CODEX STAN (2001) Codex Alimentarius Commission Standards 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2.
22. EU Council Directive 2001/110/CE relating to honey (2002a) Official Journal of the European Communities 10: 47-52.
23. Acquarone C, Buera P, Elizalde B (2007) Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. Food Chemistry 101: 695-703.
24. Fallico B, Zappalà M, Arena E (2004) Effects of heating process on chemical composition and HMF levels in Sicilian monofloral honeys. Food Chem 85: 305-313.
25. Denning DW (1998) Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 26: 781-803.
26. Xuguang S, Zhixin W, Zhiqun W, Shiyun L, Ran L (2007) Ocular fungal isolates and antifungal susceptibility in Northern China. Am J Ophthalmol 143: 131-133.
27. Perea S, Patterson TF (2002) Antifungal resistance in pathogenic fungi. Clin Infect Dis 35: 1073-1080.
28. Kaya AD, Kiraz N (2007) In vitro susceptibilities of Aspergillus spp. causing otomycosis to amphotericin B, voriconazole and itraconazole. Mycoses 50: 447-450.
29. PC (1992) The antibacterial activity of honey: 2 Variation in the potency of the antibacterial activity. Bee World 73: 59-76.
30. Finola MS, Lasagno MC, Marioli JM (2007) Microbial and chemical characterization of honeys from central Argentina. Food Chem 100: 1649-1653.
31. Koc AN, Silic S, Erçal BD, Kasap F, Hormet-Oz HT, Buldu HM (2009) Antifungal activity of Turkish honey against Candida spp. and Trichosporon spp: an in vitro evaluation. Med Mycol 47: 707-712.
32. Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Aggad H, Boucif A (2011) Antifungal Activity of a Combination of Algeria Honey and Starch of Ginger Against Aspergillus niger. Int J Microbiol Res 2: 263-266.
33. Laid B, Hama B, Moussa A (2008) Synergistic action of starch and honey against Aspergillus niger in correlation with Diastase Number. Mycoses 51: 520-522.
34. Banwart GJ (1989) Basic Food Microbiology. New York, Van Nostrand Reinhold.
35. Brudzynski K, Miotto D (2011) Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. Food Chem 127: 1023-1030.
36. Adcock D (1962) The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys. J Apic Res 1: 38-40.
37. White JW, Subers MH, Schepartz AI (1963) The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in honey glucoseoxidase system. Biochimica Biophysica Acta 73: 57-70.
38. Molan P (1992) The antibacterial activity of honey 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World 1: 5-28.
39. Aveyanov AA, Lapikova VP, Pasechnik TD, Kuznetsov VV, Baker CJ (2007) Suppression of early stages of fungus development by hydrogen peroxide at low concentrations. Plant Pathol J 6: 242-247.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtd



Document heading

Influence of temperature on the inhibitory potency of Eucalyptus honey against *Candida albicans*

Ahmed Moussa^{1*}, Djebblin Nouredine², Aissat Saad¹, Meslem Abdelmalek¹ Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun Tiaret, Algeria.² Departments of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2011

Received in revised form 27 April 2011

Accepted 28 June 2011

Available online 28 June 2011

Keywords:

Honey

Heating

Candida albicans

Antifungal activity

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effects of heat processing on the antifungal activity of honey.

Methods: A sample of the honey of eucalyptus was divided into four portions of 250 g each. One of the four portions obtained from studied honey was not heated (not heated fraction 25°C), the other portions were placed in water bath during 24 hours at 40 °C, 60 °C and 80°C temperatures. The HMF rates, Acidity, pH and the index of refraction were determined by harmonized methods. The antifungal tests (Minimum Inhibitory Concentration) were carried out on Sabouraud agar medium embedded with honey according to dilution test. **Results:** The moisture shows values of 15.65% and 15.83%, pH between 4.10 and 4.24, the free acidity ranges between 33.8 and 38.36 meq kg⁻¹, hydroxymethylfurfural (HMF) content shows values between 28.8 and 103.44 mg kg⁻¹. The antifungal action of the non-heated fraction (Fc) of honey *in vitro* was marked 40 % (vol/vol) than heated fractions of honey (42%, 44%, and 45%) vol/vol. respectively The antifungal activity of each fraction decreased in the following order: Fct₂₅ > Fct₄₀ > Fct₆₀ > Fct₈₀. **Conclusion:** our findings indicate that different levels of parameters physical-chemical properties of honey to different temperatures showed inhibitory activity against *C. albicans* with variable degrees.

1. Introduction

Candidiosis is a mycosis that is currently increasingly affecting the population in consequence of its frequency and the severity of its complications, especially among immunocompromised hosts [1]. The *Candida* species most frequently isolated from clinical sources is *Candida albicans* [2]. *C. albicans* is a commensal yeast on the mucosal surfaces in most healthy individuals, but it becomes an opportunistic pathogen under conditions that permit it to adhere and colonize epithelial tissues, causing superficial, as well as, life-threatening disseminated infections [3].

The increase in resistance to antifungals and the slow delivery of new therapeutic options from the pharmaceutical industry have lead to various studies being carried out with the aim of examining the activity of natural products against fungi that cause infections, mainly in immunocompromised individuals [4,5].

Honey forms part of traditional medicine in many cultures [6], although it is most widely used as sweetener. It is

composed of at least 181 components and is basically a solution supersaturated in sugars, the fructose (38%) and glucose (31%) are the most important [7], the moisture content is about 17.7%, total acidity 0.08%, and ashes constitute 0.18% [8].

Hydroxymethylfurfural (HMF) content is one of the most important quality parameters of the quality and health safety of honey. HMF is formed during acid-catalyzed dehydration of hexoses. [9] It is used as an indicator of honey freshness [10] Codex Alimentarius (CA) [11] proposed two quality indicators for honey, namely, 5-hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase (diastase) activity to measure the freshness of honey. Many countries have set the national limit for HMF content in honey to 40 mg/kg.

Several factors influence the formation of HMF in honey: temperature and time of heating [12], and the chemical properties of honey, which are related to the floral source from which the honey has been extracted, these indicate pH, total acidity, and mineral content [13].

Several types of honey are produced in Algeria, where honey production is a traditional practice, well implanted in several regions. The Tiaret region is located in the west of Algeria, where, due to its edaphoclimatic conditions and flora diversity, *Hedysarum coronarium*, *Eucalyptus camaldulensis* and *E. globuluss*, *Pimpinella anisum*, and *Trifolium alexandrinum* are the principal honey types

*Corresponding author: Dr Ahmed Moussa Address: Institute of Veterinary Sciences University Ibn-Khaldoun Tiaret (14000), Algeria,
Tel: +213 65234059
Fax: +213 46 425001.
E-mail: moussa7014@yahoo.fr.

produced, being Eucalyptus honey the most important unifloral one.

The present work had an aim; it was to detect which level of parameter physico-chemical properties value of honey had a potential effect on *Candida albicans*

2. Materials and methods

2.1. Honey sample

A sample of eucalyptus honey was divided into four portions of 250 g each. One of the four portions obtained for honey has not been studied heated (unheated portion 25 °C), but the other three were placed in a water bath for 24 hours at 40 °C, 60 °C, 80 °C. The four fractions of honey were examined immediately after heating for their moisture content, pH, acidity, HMF and antifungal Activity.

2.2. Physico-chemical analyses

All physicochemical tests were performed in duplicate.

2.2.1. pH

Honey pH was measured, with a combined pH glass electrode connected to pH meter Basic 20, in a solution prepared with 10 g of honey in 75 mL of distilled water [14]

2.2.2. Moisture content

The moisture content was determined based on the refractometric method. In general, the refractive index increases with the increase in the solid content. The refractive indices of honey samples were measured at ambient temperature using an Atago hand refractometer and the readings were further corrected for a standard temperature of 20 °C by adding the correction factor of 0.00023/°C. Moisture content was determined in duplicate and the % moisture content values corresponding to the corrected refractive index values were calculated using Wedmore's table [14]

2.2.3. Free acidity

Free acidity was determined by potentiometric titration [14]. Honey samples were homogenized in a water bath and filtered through gauze, prior to analysis. Ten grams of honey were then dissolved in 75 mL of distilled water, and alcoholic solution of phenolphthalein added. The solution was titrated with 0.1 N NaOH. Acidity (milliequivalent of acid per kg of honey) was determined as 10 times the volume of NaOH used in titration.

2.2.4. HMF

Hydroxymethyl furfural (HMF) was detected using a technique based on the method described by Winkler [15]. Five grams of honey were dissolved, without heating, in oxygen free distilled water and transferred to a 125 ml graduated flask and diluted to volume with oxygen free distilled water. Two millilitres of honey solution was pipetted into two tubes and 5 ml of P-touidine solution was added to each. Into one test tube, 1 ml of water was pipetted and into the other 1 ml of barbituric acid solution was added; both mixtures were then shaken. Absorbance was read using a spectrophotometer against a blank at a wave length

of 550 nm. Calculation: $\text{Mg}/100 \text{ g hydroxymethyl furfural} = \text{absorbance}/\text{test} \times 192$ [16].

2.3. Yeast strain and growth conditions

Candida albicans (Institut Pasteur of Algiers) was maintained by subculture in specific media Sabouraud agar. The inoculum suspensions was obtained by taking five colonies (>1 mm diameter) from 24 old cultures grown on Sabouraud agar. The colonies were suspended in 5 mL of sterile saline water (0.85%). The inoculum suspensions were shaken for 15 s and density adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland Standard (equivalent to $1-5 \times 10^6$ cfu/mL).

2.4. Minimum inhibitory concentration measurement (MIC)

Increased concentrations of honey (10–50 % vol/vol) were incorporated into media to test their efficiency against *Candida albicans*. Each plate with final volume of honey and media of 5 ml was inoculated and incubated at 37°C for 48 h. The MIC was determined by finding the plates with the lowest concentration of honey on which the strain would not grow. All MIC values are expressed in % (vol/vol). Were added to a range of honey concentrations lower than the MIC

3. Results

3.1. Physicochemical parameters

3.1.1. pH

All fractions of honeys analyzed were found to be acidic in character their pH values ranged from 4.10 to 4.24 (Table1). In general, honey is acidic in nature irrespective of its variable geographical origin. The pH values of Algerian, Morocco and Portugal honeys have been found to vary between 3.49 to 4.53, 3.52 to 5.13, and 3.45 to 4.70, respectively [17–19]

3.1.2. Moisture content

Honey moisture content depends on various factors such as harvesting season, degree of maturity reached in the hive and climatic factors [20]. Values between 15.56 g/100 g and 15.83 g/100 g were obtained. All fractions tested of honey had moisture contents below 20 g/100 g, which is the maximum prescribed limit as per the Codex standard for honey [21].

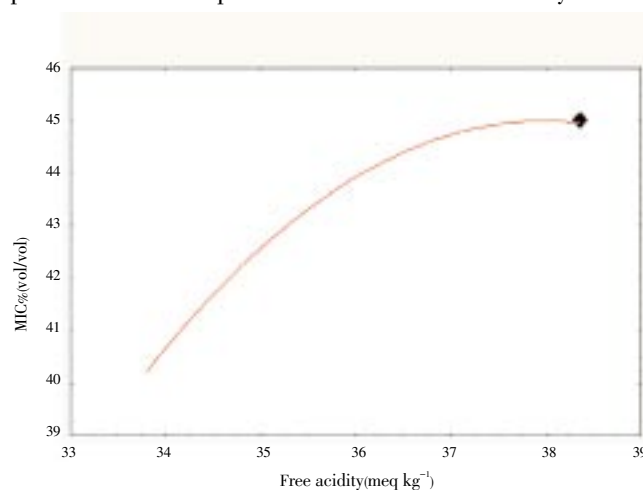
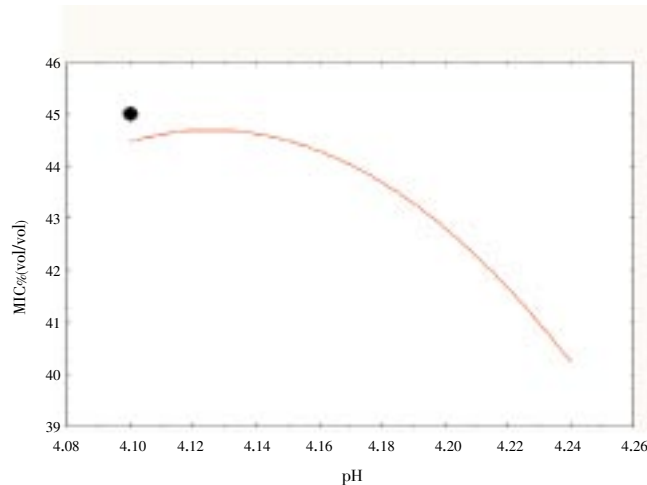


Figure 3. Variation of Free acidity / MIC % (vol/vol)

Table 1.Heat treatment, acidity, pH, and HMF and growth inhibition of *C. albicans* in different honey fractions.

Honey	pH	Moisture content%	Free acidity meq kg ⁻¹	HMF(mg /kg)	MIC% (vol/vol)
Ht25	4.24	15.83	33.8	28.8	40
Ht40	4.22	15.83	34.49	43.29	42
Ht60	4.11	15.65	36.25	78.32	44
Ht80	4.10	15.65	38.36	103.44	45

**Figure 1.** Variation of pH / MIC % (vol/vol)

3.1.3. Free acidity

Acidity affects the flavor and aroma of honey and is due to the presence of organic acids, particularly gluconic, pyruvic, malic and citric, in equilibrium with lactones or esters and inorganic ions [22]. The free acidity ranged between 33.8 meq kg⁻¹ and 38.36 meq kg⁻¹ were obtained. Values for free acidity were below the allowed limits (50 meq kg⁻¹) [23].

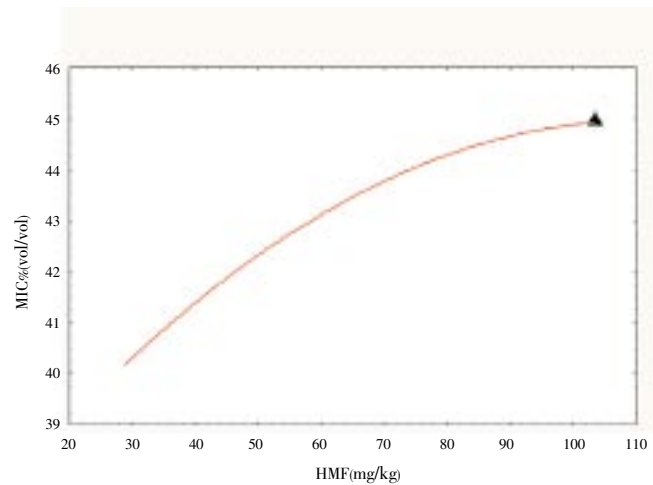
3.1.4. HMF values

The HMF content is widely recognized as a parameter of honey samples freshness, because it is absent in fresh honeys and tends to increase during processing and/or aging of the product. Several factors influence the levels of HMF, such as temperature and time of heating, storage conditions, pH and floral source, thus it provides an indication of overheating and storage in poor conditions [24]. HMF shows values between 28.8 and 43.29 mg kg⁻¹, fractions 3 and 4 with values between 78.32 and 103.44 mg kg⁻¹ exceeded the limits set by European Community legislation [21] due to overheating.

3.2. Assay for inhibitory activity of honey on *C. albicans* growth

The different level of value for the four fractions of honey showed antifungal activity against *C. albicans* to varying degrees, the table (1).

HMF value of honey (28.8 mg kg) showed the highest inhibitory effect on yeast growth compared to treated fractions by heat (Figure 2). Similarly, free acidity value of honey (33.8 meq kg⁻¹) showed the highest inhibitory effect on yeast growth compared to treated fractions by heat (Figure 3). Furthermore, pH value of honey 4.24 showed the highest inhibitory effect on yeast growth compared to treated fractions by heat (Figure 1).

**Figure 2.** Variation of HMF content / MIC % (vol/vol)

4. Discussion

In recent years, drug-resistance to antifungal agents and optimizing therapy of candidal infections has been broadly focused [22]. Honey is a natural product that is used for its antifungal activity [23-25]. Several factors may influence the antifungal activity of honey. For example, DeMera and Angert [26] reported that honey from different phytoecographic regions varied in their ability to inhibit the growth of yeasts, suggesting that botanical origin plays an important role in influencing the antifungal activity.

The high sugar concentration, hydrogen peroxide, and the low pH are well-known antibacterial factors in honey and more recently, methylglyoxal and the antimicrobial peptide bee defensin-1 were identified as important antibacterial compounds in honey. [27]. Hydrogen peroxide (H₂O₂) is the major contributor to the antimicrobial activity of honey, and the different concentrations of this compound in different honeys result in their varying antimicrobial effects [28]. Factors known to affect H₂O₂ accumulation are inactivation of the H₂O₂-producing enzyme glucose oxidase by exposure to heat or light [29,30] or degradation of H₂O₂ by honey [31,32].

Mulu et al [33] studied the antifungal activity of honey in sensitivity tests on 25 strains of *Candida* yeasts and showed clear antifungal activity against yeasts tested. Furthermore, Khosravi et al [34] reported that honey had antifungal activity against *Candida* species such as *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Candida kefyr*, *C. glabrata*, and *C. dubliniensis*. Al-Waili [35] found that honey concentration ranging from 30% to 50% inhibited the growth of several pathogenic microorganisms, including *C. albicans*. Ahmed et al [36-38] reported antifungal efficacy of various honeys against clinical isolates of *C. albicans*, *Rhodotorula sp* and *Aspergillus niger*. Collectively, our findings indicate that different levels of parameters physical-chemical properties of honey to different temperatures showed inhibitory activity

against *C. albicans* with variable degrees.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

References

- [1] László G, Andrea B, Mónica H, Máté V, Tamás P and Csaba V. In vitro antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against different *Candida* species. *Mycoses* 2010; **54**, e737–e743. doi:10.1111/j.1439–0507.2010.02010.x.
- [2] Romeo O, Criseo G. Molecular epidemiology of *Candida albicans* and its closely related yeasts *Candida dubliniensis* and *Candida africana*. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 212–4.
- [3] Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microb Rev* 2007; **20**, 133–163.
- [4] Rex JH, Rinald MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 1–8.
- [5] Bachmann SP, Patterson TF, Ribot JL. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microb* 2002; **40**: 2228–2230.
- [6] Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Bio Anal* 2006; **41**:1220–34.
- [7] Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem* 2002; **50**:5870–7.
- [8] Nagai T, Inoue R, Kanamori N, Suzuki N, Nagashima T. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chem* 2006; **97**:256–62.
- [9] Belizt HD and Grosch W. Química de los Alimentos. Acribia, Zaragoza, 2007; 923–955.
- [10] Terrab A, Diez MJ and Heredia FJ. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem* 2002; **79**:373–379.
- [11] Codex Alimentarius Commission. Revised codex standard for honey. Codex Standard 2001;12–1981. Rome: FAO and WHO.
- [12] Bath, P. K. and Singh, N. A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Food Chemistry* 1999; **67**: 389–397.
- [13] Ibarz, A., Casero, T., Miguelsanz, R. and Pagon, J. *Alimentaria* 1989; **199**, 81 – 84.
- [14] AOAC Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington. 1990
- [15] Winkler C. Beitrag Zur Nachweis und Zur Bestimmung Von Kunsthoning. *Zeitschr. Lebensm. Unters. Forsch.* 1955; **102** (3), 161–167.
- [16] Auerbach F. & Borries G. Auerbach and Borries equation. *Z. Nahr. Genesm* 1924; **22**, 353–358.
- [17] Ouchemoukh S., Louaileche H., Schweutzer P., Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys, *J. Food Control* 2005; 52–58.
- [18] Amina C., Abderrahmane R., Gian L M., Paola F. Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. doi:10.1016/j.arabjc.2011.10.013.
- [19] Luís R. S., Romeu V., Andreia P. M., Patrícia V., Paula B. A. Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal* 2009; **93** 73–77.
- [20] Finola, M. S., Lasagno, M. C., & Marioli, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry* 2007; **100**, 1649–1653.
- [21] Codex Alimentarius Commission. Revised codex standard for honey. Codex Standard 2001;12–1981. Rome: FAO and WHO.
- [22] Echingo, T., Takenaka, T. Production of organic acids in honey by honey bees. *J Agr Chem Soc Japan* 1974; **48**: 225–230.
- [23] The Council of the European Union, Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Official Journal of the European Communities* 2002; **1**(10), 47–52.
- [24] Fallico, B., Zappalà, M., Arena, E. et al. Effects of heating process on chemical composition and HMF levels in Sicilian monofloral honeys. *Food Chem* 2004; **85**: 305–313.
- [25] Lai, C.C., Tan, C.K., Huang, Y.T., Shao, P.L., Hsueh, P.R. Current challenges in the management of invasive fungal infections. *Journal of Infective Chemotherapy* 2008; **14**, 77–85.
- [26] Manila C, Barbara C, Elena P. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chemistry* 2012; **131** : 493–499.
- [27] Koc AN, Silici S, Ercal BD, Kasap F, Hörmet–Oz HT, Mavus–Buldu H. Antifungal activity of Turkish honey against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp: an in vitro evaluation. *Med Mycol* 2009; **47**(7):707–12.
- [28] Irish J, Carter DA, Shokohi T, Blair S: Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Med Mycol* 2006; **44**:289–291.
- [29] DeMera, JH., Angert ER, Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytoecographic regions of Costa Rica. *Apidologie* 2004; **35**:411–417.
- [30] Paulus H. S. Kwakman and Sebastian A. J. Zaat. Antibacterial Components of Honey.; *IUBMB Life* 2012, **64**(1): 48–55.
- [31] Molan P. C., “The antibacterial activity of honey: the nature of the antibacterial activity,” *Bee World*, 1992; **73**:1,5–28.
- [32] White, J. W. Jr. and Subers, M. H. (1964) Studies on honey inhibition. 3. Effect of heat. *J. Apicult. Res* 1992; **3**, 45–50.
- [33] Mulu A, Diro E, Tekleselassie H, Belyhun Y, Anagaw B, Alemayehu M, Gelaw A, Biadlegne F, Desalegn K, Yifuru S, Tiruneh M, Kassu A, Nishikawa T, and Isogai E. Effect of Ethiopian multiflora honey on fluconazole-resistant *Candida* species isolated from the oral cavity of AIDS patients. Doi: 10.1258/ijasa.2010.010140 *Int J STD AIDS* 2010; **21**:11 741–745.
- [34] Khosravi, A.R., H. Shokri, F. Katirae and F. Taherel, Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. *J. Apicult Res* 2008; **47**: 256–260.
- [35] Al–Waili N. Therapeutic and prophylactic effects of crude honey on chronic seborrheic dermatitis and dandruff. *Eur J Med Res* 2001; **6**:306–308.
- [36] Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Meslem A, Benhalima A. (2012). Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 1–4. (in press)
- [37] Ahmed M, Djebli N, Hammoudi SM, Aissat S, Akila B, Hemida H. Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. 2012; *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 253–255.
- [38] Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Aggad H and Boucif Ahmed. (2011). Antifungal Activity of a Combination of Algeria Honey and Starch of Ginger Against *Aspergillus niger*. *IJMR* 2011; **2** (3): 263–266.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtm



Document heading doi:

Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*

Ahmed Moussa^{1*}, Djebli Nouredine², Hammoudi Si Mohamed¹, Meslem Abdelmelek¹, Aissat Saad¹

¹Institute of Veterinary Sciences University Ibn– khadoun Tiaret (14000), Algeria

²Departments of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 November 2011

Received in revised form 15 January 2012

Accepted 15 March 2012

Available online 20 October 2012

Keywords:

Honey

Antibacterial activity

Staphylococcus aureus

Streptococcus pyogenes

ABSTRACT

Objective: To assess the *in vitro* antibacterial activity of honey from different geographical location on Gram negative organisms. **Methods:** Different concentrations (Undiluted honey, 10 %, 30%, 50% and 70% wt/vol) of honey were studied *in vitro* using *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), briefly, two–fold dilutions of honey solutions were tested to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against each type of microorganism, followed by more assays within a narrower dilution range to obtain more precise MIC values. MICs were determined by both visual inspection and spectrophotometric assay at 620 nm. These honey samples were compared with standard antibiotics like ampicillin, penicillin G, amoxicillin, gentamycin, tobramycin, erythromycin and chloramphenicol was determined by the disc diffusion method. **Results:** The diameter of zone of the inhibition (ZDI) of honey has various concentrations tested for the isolates ranged 0–46 mm for *S. aureus*, 0–44 mm for *S. pyogenes*. While the MIC (%) ranged 12%–95%, 25%–73% respectively. **Conclusions:** Algeria honey, *in-vitro*, possess antibacterial activity.

1. Introduction

The emergence in recent years of numerous resistant strains of pathogenic bacteria to a range of formerly efficient antibiotics constitutes a serious threat to public health[1]. Natural products have been traditionally used in the control of various diseases, because they are a source of many active compounds that show multiple therapeutic effects, in addition to constituting models for the synthesis of a large number of pharmaceuticals[2].

The use of honey as a traditional remedy for microbial infections dates back to ancient times. The antibacterial activity of honey refers to some bee products, presence of “inhibin” which acts as an antibacterial factor other than H₂O₂, several factors such as osmotic properties of honey which is saturated or super saturated solution of sugars, 84% being a mixture of fructose and glucose, so inhibition by osmotic effect of dilute solutions of honey obviously

depends on the species of bacterial[3].

Hydrogen peroxide is the major contributor to the antimicrobial activity of honey, and the different concentrations of this compound in different honeys result in their varying antimicrobial effects[4].

Recently, many researchers have reported the antibacterial activity of honey against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), and *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*)[5,6].

The potential antibacterial of diluted honey originating in several countries was already studied[7–10]. Hence till date Algeria honeys has been used mostly as home remedy. Due to lack of adequate scientific research and documentation the medicinal proprieties of Algeria honeys still remain mostly in dark.

The aim of the present study was to investigate the antibacterial activities of four different Algeria honey collected from different localities against different resistance pathogenic microorganisms. Also, antibacterial activities of certain antibiotics commonly used in the treatment of infections caused by these resistance pathogenic bacteria were evaluated.

*Corresponding author: Ahmed Moussa, Institute of Veterinary Sciences University Ibn– khadoun Tiaret (14000), Algeria.
Tel: +213 65234059.
Fax: +213 46 425001.
E-mail: moussa7014@yahoo.fr.

2. Materials and methods

2.1. Honey samples

During the 2011 flowering seasons, four honey samples were gathered and provided by various bee-keepers from two area different from the Algeria west. These honey samples were aseptically collected in sterile screwed cups and kept in a cool and dry place (at room temperature) overnight before they were finally transported to the laboratory.

2.2. Preparation of honey solutions

Honey solutions were prepared immediately prior to testing by diluting honey to the required concentrations (Undiluted, 10%, 30%, 50%, or 70%, wt/vol). All samples were then incubated for 30 min at 37 °C in a shaking water bath that allowed aeration of the solutions. Incubation was carried out in the dark because both hydrogen peroxide and glucose oxidase are light sensitive^[11].

2.3. Test organisms

Micro-organisms were obtained from the department of biomedecine, of the institute of sciences vétérinaires university Ibn-khaldoun, Algeria. Two strains of the gram-positives bacteria were *S. aureus* and *S. pyogenes*.

2.4. Preparation of inoculums

One single colony of each type of microorganism (from the nutrient agar stock culture) was inoculated with a sterile loop, and was transferred into 10 mL sterile nutrient broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The broth cultures were incubated in a shaking incubator at 37 °C for 24 h.

2.5. Antibacterial activity

Three different methods were used to evaluate the antimicrobial activity of honey: well and disc diffusions Spectrophotometric assay, respectively^[12].

Antibacterial activity of honey as evaluated using agar disc diffusion method against test microorganisms. A total of 100 µL of fresh culture suspension of the test microorganisms was spread on respective media Mueller Hinton agar plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The concentration of cultures was 1×10^7 CFU/ mL. For screening, sterile, 5 mm diameter filter paper disc were impregnated with 10 µL of honey equivalent to 0.1 mg of honey after being placed on the surface of the inoculated media agar plates. The plates were stood at 4 °C for 2 h before being incubated under optimum conditions for 24 h. Clear inhibition zones around the discs indicated the presence of antimicrobial activity. The diameters of the inhibition zones were measured in millimeter, including the diameter of disc. The controls were set up with equivalent quantities of water as control.

The agar diffusion technique (well diffusion method) was employed. The honey samples were first inoculated separately on standard nutrient media (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). With no test organisms so as to evaluate their possible contamination. Thereafter, solidified nutrient agar plates were separately flooded with the liquid inoculums of the different test organisms using the pour

plate method. The plates were drained and allowed to dry at 37 °C for 30 mins after which four equidistant wells of 5 mm in diameter were punched using a sterile cork borer at different sites on the plates. 50 µL of the different concentrations (undiluted, 30%, 50% and 70% wt/v) of the honey samples were separately placed in the different punched wells with 1 mL sterile syringe. The plates were allowed to stay for 15 min for pre-diffusion to take place followed by an overnight incubation that lasted for 24 h at 37 °C. The diameter of zones, including the diameter of the well, was recorded. Each assay was carried out in triplicate.

2.6. Minimum inhibitory concentration (MIC) determination.

Up to 0.2 mL of the cell suspension was inoculated into 4 mL volume of honey concentration in a test tube while inoculation of 4 mL volume of nutrient broth with 0.2 mL of the cell suspension served as control. The optical density was determined in a spectrophotometer at 620 nm prior to incubation (T_0) and recorded after which, the cultures were incubated for 24 h in the dark at 37 °C with constant shaking to prevent adherence and clumping. After 24 h of incubation, the optical densities were again determined (T_{24}) and recorded. The optical density for each replicate at T_0 was subtracted from the optical density for each replicate at determined using the formula:

$$\text{Percentage inhibition} = 1 - (\text{OD test}/\text{OD control}) \times 100$$

Where the resulting measurement recorded a negative inhibition value (growth promotion), this was reported as stimulation using the formula:

$$\text{Percentage inhibition} = (\text{OD test}/\text{OD control}) \times 100$$

The minimum and maximum values were 0% and 100%, respectively.

2.7. Antibiotic susceptibility assay

Antibiotic susceptibility for the pathogens and their reference strains was detected using the disk diffusion method, according to the standards set by the CLSI^[13]. An aliquot of 100 mL of an overnight culture was diluted in saline solution to about 1.5×10^7 CFU/mL (0.5 Units of McFarland turbidity standard). Mueller Hinton agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) plates were flooded with this suspension to give confluent colonies.

For the *S. pyogenes* the Susceptibility to antibiotics was determined using the disc diffusion assay on Muller Hinton agar plates (MHA; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) supplemented with 5% defibrinated sheep blood. The inoculated plates were allowed to stand at room temperature for 15 min prior to dispensing the paper disks and the plates incubated at 37 °C for 24 h. The diameters of the clear zones around each disk were measured after incubation.

3. Results

Antibacterial activity of the four honey samples were done with four concentrations 10% (wt/v), 30% (wt/v), 50% (wt/v), 70% (wt/v) and undiluted used in this study are shown in Table 1.

Table 1Antibacterial activity (zone of inhibition in mm) and MIC% (vol/vol) of honeys at different concentrations against *S. aureus* and *S. pyogenes*.

Honey dilution	Gram-positive bacteria							
	<i>S. aureus</i>				<i>S. pyogenes</i>			
	Well (mm)	Disc (mm)	Spectrophotometry	MIC% (vol/vol)	Well (mm)	Disc (mm)	Spectrophotometry	MIC% (vol/vol)
Honey A	Undiluted	36	40	68	39	22	68	
	10%	0	0	84	0	0	25	
	30%	0	0	12	25	7	>100	
	50%	37	34	>100	25	19	>100	
	70%	0	0	>100	27	0	>100	
Honey B	Undiluted	40	43	62	44	35	73	
	10%	0	0	87	0	0	30	
	30%	0	0	24	30	0	>100	
	50%	38	35	>100	25	17	>100	
	70%	0	0	>100	32	16	>100	
Honey C	Undiluted	46	41	73	39	27	74	
	10%	0	0	95	0	0	47	
	30%	0	0	>100	27	14	>100	
	50%	37	38	>100	25	20	>100	
	70%	0	0	>100	31	18	>100	
Honey D	Undiluted	38	38	54	41	27	59	
	10%	0	0	66	0	0	55	
	30%	0	0	>100	29	14	>100	
	50%	34	34	>100	20	17	>100	
	70%	0	0	>100	33	19	>100	

The sensitivity of *S. aureus* and *S. pyogenes* against the honey samples studied was screened. Table 1 shows the diameter values of inhibition of *S. aureus* and *S. pyogenes* growth in presence of honey concentrations (Undiluted, 10%, 30%, 50% and 70%) wt/vol. The antibacterial activity was classified as: no sensitive, for diameters lower than 8 mm; sensitive, for diameters from 8 to 14 mm; very sensitive, for diameters from 15 to 19 mm; extremely sensitive, for diameters higher than 20 mm.

Either *S. aureus* or *S. pyogenes* were susceptible to Gentamycin (GM), Chloramphenicol (CHL) and Tobramycin (TBO) but showed resistance to Penicillin G (P), Ampicillin (AM), Oxacillin (OX) and Erythromycin (ERY)

4. Discussion

Disease causing bacteria have always been considered a major cause of morbidity and mortality in humans. The appearance of resistant microorganisms paved the way to the occurrence of infections that are only treated by a limited number of antimicrobial agents^[14]. The emergence of resistant gram positive bacteria presents a major challenge for the antimicrobial therapy of infectious diseases and increases the incidence of mortality and morbidity. Currently, many researchers have reported the antibacterial activity of honey and found that natural unheated honey has some broad-spectrum antibacterial activity when tested against pathogenic bacteria, oral bacteria as well as food spoilage bacterial^[15,16].

The antibacterial nature of honey is dependent on various factors working either singularly or synergistically, the most salient of which are H₂O₂, phenolic compounds,

wound pH, pH of honey and osmotic pressure exerted by the honey^[17]. Hydrogen peroxide is the major contributor to the antimicrobial activity of honey, and the different concentrations of this compound in different honeys result in their varying antimicrobial effects^[18].

Several authors reported that different honeys vary substantially in the potency of their antibacterial activity, which varies with the plant source^[19–21].

Dilution of honey was observed by Basualdo *et al*^[22] who found honey inhibited the growth of *S. aureus* even at 50% dilution. Undiluted honey samples also inhibited the growth of *Staphylococcus uberis* (*S. uberis*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), although to a lesser extent.

Agbagwa and Frank–Peterside^[23] examined different honey samples: Western Nigerian honey, Southern Nigerian honey, Eastern Nigerian honey and Northern Nigerian honey, and compared their abilities to inhibit the growth of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) with an average of ZDIs (5.3–11.6) mm, (1.4–15.4) mm, (4.4–13.5) mm and (9.1–17) mm, respectively, and with honey concentrations of 80%–100%.

Also, Nzeako and Hamdi^[24] in their studies of six commercial honeys found that inhibition of *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* did not occur at honey concentrations less than 40% (wt/vol). Similarly, Iurlina and Fritz^[24–27] found that honey diluted to concentrations from 75% to 1% (w/v) of full-strength honey showed total antibacterial activity. Also Ahmed *et al*^[28] evaluated the *E. coli* and *S. aureus* growth in media containing different concentrations of honey and found that the two bacteria failed to grow in honey at a concentration between 5% and 70%. The Tualang honey has been reported to be effective against *E. coli*,

Salmonella typhi (*S. typhi*) and *S. pyogenes*^[29], and thus, when taken orally in its pure undiluted form, this honey may help speed up recovery from such infections. In practice, when undiluted honey is applied to wounds, it is diluted by exudates and its antimicrobial activity at low concentrations is therefore, crucial. For clinical use, the selection of honeys with high levels of antibacterial activity is indicated to maximize therapeutic effects^[30]

Some of the standard antibiotics as penicillin, ampicillin, oxacilline, and erythromycin were not effective on the test bacterial isolates.

In the present study, the antibacterial activity was tested using the well and disc–agar diffusion assay and The honey samples were tested without dilution and at 70%, 50%, 30% and 10% (w/v) dilution Most of the undiluted honey samples inhibited the growth of *S. aureus* and *S. pyogenes*.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

References

- [1] Raymond Moukeu S, Rosalie Ngono AN, Paul Lunga K, Martin Koanga M, Alambert Tiabou T, Guy Njateng SS, et al. Antibacterial and dermal toxicological profiles of ethyl acetate extract from *Crassocephalum bauchiense* (Hutch.) Milne–Redh (Asteraceae). *BMC Complemen Altern Med* 2011; **11**: 43.
- [2] Matos FJA. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. 4th ed. Fortaleza: Editora UFC; 2002.
- [3] Saadia Hassanein M, Hassan M Gebreel, Abdel–Rahman Hassan A. Honey compared with some antibiotics against bacteria isolated from burn–wound infections of patients in Ain Shams University Hospital. *J Am Sci* 2010; **6**(10): 510.
- [4] Molan PC. The antibacterial activity of honey: the nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992; **73**(1): 5–28.
- [5] Hassanain AT, Alyaa AK, Karim AJ. Antimicrobial effect of Malaysian honey on some human pathogens: an *in vitro* Study. *IMJM* 2010; **9**(2) : 98.
- [6] Rajneeta S, Vincent B, Dhana R, Prashant S, Peter M. The antimicrobial efficacy of Fijian honeys against clinical isolates from diabetic foot ulcers. *J ApiProduct ApiMedical Sci* 2009; **1** (3): 64–67 .
- [7] Nur–Azida MN, Ahmad SH, Kirmpal–Kaur BS, Ananda AD, Mehru– Nisha MH. Antimicrobial properties of tualang honey and its effect in burn wound management: a comparative study. *BMC Complemen Altern Med* 2010; **10**: 31.
- [8] Voidarou C, Alexopoulos A, Plessas S, Karapanou A, Mantzourani I, Stavropoulou E, et al. Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe* 2011; **1**: 1–5.
- [9] Sherlock O, Anthony D, Rahma A, Alice P, Georgina G, Seamus C, et al. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin–resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complemen Altern Med* 2010; **10**: 47.
- [10] Hayam M Hamouda, Dalia SM. Antibacterial activity of Egyptian honey from different sources. *Int J Microbiol Res* 2011; **2** (2): 149–155.
- [11] White JW, Subers MH. Studies on honey inhibine. effect of heat. *J Apic Res* 1964b; **3**(3):45–50.
- [12] Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *J Microbiol Met* 2006; **64**: 84–95.
- [13] National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests*. PA: NCCLS Publications; 1993, p. M2–A5.
- [14] Roulia AM, Elias A, Elias B, Ziad D. Antibacterial activity of the extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, and *Trigonella foenum–graecum* on highly drug resistant gram Negative bacilli. *J Botany* 2010, Article ID: 464087, 1–8 doi:10.1155/2010/464087.
- [15] Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Res* 2005; **36**: 464–467.
- [16] Mundo MA, Padilla–Zakour OI, Worobo RW. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int J Food Microbiol* 2004; **97**: 1–8.
- [17] Manisha Deb M, Shyamapada M. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; **2**: 154–160.
- [18] Molan PC. The antibacterial nature of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992; **73**: 5–28.
- [19] Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch Med Res* 2005; **36**: 464–467.
- [20] Mundo MA, Padilla–Zakour OI, Worobo RW. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int J Food Microbiol* 2004; **97**: 1–8.
- [21] Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Food* 2005; **8**: 100–103.
- [22] Basualdo C, Sgroy V, Finola MS, Marioli JM. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Vet Microbiol* 2007; **124**: 375–381.
- [23] Agbagwa OE, Frank–Peterside N. Effect of raw commercial honeys from Nigeria on selected pathogenic bacteria. *Afr J Microbiol Res* 2010; **4**: 1801–1803.
- [24] Nzeako Hamdi. Antimicrobial potential of honey. *Med Sci* 2000; **2**: 75–79.
- [25] Moussac A, Noureddine D, Abdelmelek M, Saad A. Antibacterial activity of various honey types of Algeria against pathogenic gram–negative bacilli: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Dis* 2012; **2**(3): 211–214.
- [26] Ravikumar S, Gokulakrishnan R, Boomi P. *In vitro* antibacterial activity of the metal oxide nanoparticles against urinary tract infectious bacterial pathogens. *Asian Pac J Trop Dis* 2012; **2**(2): 85–89.
- [27] Iurlina MO, R Fritz. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *Int J Food Microbiol* 2005; **105**: 297–304.
- [28] Ahmed M, Aissat S, Djebli N, Boulkaboul A, Abdelmalek M, Khiati Baghdad. The influence of starch of Ginger on the antibacterial activity of honey of different types from Algeria against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Microbiol Res* 2011; **2**(3): 258–262.
- [29] Tumin N, Halim NA, Shahjahan M, Noor Izani NJ, Sattar MA, Khan AH, et al. Antibacterial activity of local Malaysian honey. *Malaysian J Pharma Sci* 2005; **3**: 1–10.
- [30] Nagi A AL–Haj, Amghalia E Mariana, Shamsudin N, Rasedee A, Rahmah M, Zamberi S. Antibacterial activity of honey against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Res J Biol Sci* 2009; **4** (8): 943–947.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtd



Document heading

Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram–Negative Bacilli: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*

Ahmed Moussa^{1*}, Djebli Noureddine², Meslem Abdelmelek¹, Aissat Saad¹¹Institute of Veterinary Sciences University Ibn– khadoun Tiaret (14000), Algeria.²Departments of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2012

Received in revised form 27 April 2012

Accepted 28 May 2012

Available online 28 June 2012

Keywords:

Antibacterial activity

*Escherichia coli**Pseudomonas aeruginosa*

Minimum inhibitory concentration

ABSTRACT

Objective: To assess the *in vitro* antibacterial activity of different honey types in Algeria on Gram negative organisms. **Methods:** Different concentrations (10, 30, 50, 70, 100 % v/v) of honey were studied *in vitro* using *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Briefly, two–fold dilutions of honey solutions were tested to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against each type of microorganism, followed by more assays within a narrower dilution range to obtain more precise MIC values. MIC was determined by both visual inspection and spectrophotometric assay at 620 nm. The antibacterial activity of these honey samples was determined by the disc and well diffusion method. **Results:** The zone diameter of inhibition of honey for *P. aeruginosa* and *E. coli* was 0–30 and 0–38 mm, respectively, while the MIC ranged 90–91% and 56–96%, respectively. **Conclusions:** The results show that Algerian honeys possess antibacterial activity against Gram negative bacilli, and it can be developed into antibacterial agents.

1. Introduction

The evolution and spread of antibiotic resistance, as well as the evolution of new strains of disease causing agents, is of great concern to the global health community. Our ability to effectively treat disease is dependent on the development of new pharmaceuticals, and one potential source of novel drugs is traditional medicine[1]. The use of traditional medicine to treat infection has been practiced since the origin of mankind, and honey produced by *Apis mellifera* is one of the oldest traditional medicines considered to be important in the treatment of several human ailments[2]. However, large variations in the *in vitro* antibacterial activity of various types of honey have been reported and thus hampered its acceptance in modern medicine[3]. The

in vitro antimicrobial activity of honey was reported by Mohapatra *et al*[4] who observed that honey stopped the growth of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and *Escherichia coli* (*E. coli*). Honey has a potent antibacterial activity and is very effective in protecting wounds from infection[5]. In some bee products, the antibacterial activity of honey is attributed to the presence of “inhibin”, which acts as an antibacterial factor other than hydrogen peroxide. While in other products, several other factors play important roles like osmotic properties of honey which is saturated or super saturated solution of sugars with 84% being a mixture of fructose and glucose[6]. Thereby, the inhibitory activity caused by the osmotic effect of honey dilutions obviously depends on the species of bacteria. Hydrogen peroxide is the major contributor to the antimicrobial activity of honey, and the different concentrations of this compound in different honeys result in their varying antimicrobial effects[7]. The potential antimicrobial of diluted honey originating in several countries was already studied[8–11]. However, to our knowledge, no study was carried out before on Algeria honey. The aim of the present study was to investigate the antibacterial activities of four different Algeria honey

*Corresponding author: Ahmed Moussa, Institute of Veterinary Sciences University Ibn– khadoun Tiaret (14000), Algeria.

Tel.: +213 65234059. Fax: +213 46 425001.

E–mail: moussa7014@yahoo.fr.

Foundation project: This work was financially supported by project CNEPRU, Institute of Veterinary Sciences (IVS), University Ibn–Khadoun (TIARET), Algeria.[grant No.F023 2009 / 0009].

collected from different localities. They were tested against different resistance pathogenic microorganisms. Also, antibacterial activities of certain antibiotics commonly used in the treatment of infections caused by these resistance pathogenic bacteria were evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Honey Samples

During the 2011 flowering seasons, four honey samples were gathered and provided by various bee-keepers from two areas different from the Algeria west. These honey samples were aseptically collected in sterile screwed cups and kept in a cool and dry place at room temperature overnight before they were finally transported to the laboratory.

2.2 Preparation of honey solutions

Honey solutions were prepared immediately before testing by diluting honey to the required concentrations (10, 30, 50, 70 and 100%, v/v). All samples were then incubated for 30 minutes at 37°C in a shaking water bath that allowed aeration of the solutions. Incubation was carried out in the dark because both hydrogen peroxide and glucose oxidase are light sensitive^[12].

2.3 Test organisms

Micro-organisms were obtained from the Department of Biomedecine, the Institute of Sciences Veterinary University Ibn-khaldoun, Algeria. Two strains of the gram-negatives bacteria: *E.coli* and *P. aeruginosa*.

2.4 Preparation of test organisms

Stocked cultures of *E. coli* and *P. aeruginosa* used in this study were obtained from the Department of Microbiology, Ibn-khaldoun University, Tiaret, Algeria. The isolates were identified based on standard microbiological techniques, and sub-cultured in nutrient agar slopes at 37 °C for 24 h. Colonies of fresh cultures of the different microorganisms from overnight growth were picked with sterile inoculating loop and suspended in 3–4 mL nutrient broth contained in sterile test tubes and incubated for 2–3 h at 37 °C. This was diluted with distilled water to set inoculum density used in this study.

2.5 Antibacterial activity

Three different methods were used to evaluate the

antimicrobial activity of honey: well and disc diffusions, and Spectrophotometric assay^[13].

Antibacterial activity of honey was tested using agar disc diffusion method against microorganisms. Fresh culture suspension of the test microorganisms (100 µL) was spread on Mueller Hinton agar plates. The concentration of cultures was 1×10^7 CFU/ mL. For screening, 5 mm sterile diameter filter paper disc were impregnated with 10 µL of honey equivalent to 0.1 mg of honey. The plates were placed at 4 °C for 2 h before being incubated under optimum conditions for 24 h. Clear inhibition zones around the discs indicated the presence of antimicrobial activity. The zone diameters of inhibition (ZDI) was measured in millimeter, including the diameter of disc. The controls were set up with equivalent quantities of water as control.

The well diffusion method was also employed. The honey samples were first inoculated separately on standard nutrient media with no test organisms so as to evaluate their possible contamination. Thereafter, solidified nutrient agar plates were separately flooded with the liquid inoculums of the different test organisms using the pour plate method. The plates were drained and allowed to dry at 37°C for 30 mins after which four equidistant wells of 5 mm in diameter were punched using a sterile cork borer at different sites on the plates. 10 µL of the different concentrations (10, 30, 50, 70, 100% v/v) of the honey samples were separately placed in the different punched wells with 1 mL sterile syringe. The plates were allowed to stay for 15 mins for pre-diffusion to take place followed by an overnight incubation that lasted for 24 hrs at 37 °C. The ZDI and the diameter of the well were recorded. Each assay was carried out in triplicate.

2.6 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination

Up to 0.2 mL of the cell suspension was inoculated into 4 mL volume of honey concentration in a test tube while inoculation of 4 mL volume of nutrient broth with 0.2 mL of the cell suspension served as control. The optical density was determined and recorded in a spectrophotometer at 620 nm before incubation (T_0), after which, the cultures were incubated for 24 h in the dark at 37°C with constant shaking to prevent adherence and clumping. After 24 h of incubation, the optical densities were again determined and recorded (T_{24}). The optical density for each replicate at T_0 was subtracted at determined using the formula:

$$\text{Percentage inhibition} = 1 - (\text{OD test}/\text{OD control}) \times 100$$

Where the resulting measurement recorded a negative inhibition value (growth promotion), this was reported as stimulation using the formula:

$$\text{Percentage inhibition} = (\text{OD test}/\text{OD control}) \times 100$$

2.7 Antibiotic susceptibility test

Susceptibility to a panel of antimicrobial agents was determined by the standardized disc diffusion assay on Mueller–Hinton agar with commercial antimicrobial susceptibility discs according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI/NCCLS. The antibiotics tested and their corresponding disc concentrations were as follows: penicillin G (10 IU), amoxicillin (25 µg), ampicillin (10 µg), amoxicillin (25 µg), gentamicin (10 µg), tobramycin (10 µg), chlo (30 µg), and erythromycin (15 IU). The plates were then incubated at 37 °C for 24 h to 48 h. The ZDI was recorded and the data was interpreted using CLSI standards^[14].

3. Results

The results of the assays of antibacterial activity of the four honey samples with five concentrations (10, 30, 50, 70, 100% v/v) used in this study are shown in tables 1. The susceptibility of bacteria to antibiotic was tested as shown in Table 2 .

The sensitivity of *E. coli* and *P. aeruginosa* against the honey samples studied was screened. Table 1 shows the ZDI of *E. coli* and *P. aeruginosa* growth in presence of honey concentrations(10, 30, 50, 70 100% v/v). The antibacterial activity was classified as: no sensitive, for diameters lower than 8 mm; sensitive, for diameters from 8 to 14 mm; very sensitive, for diameters from 15 to 19 mm; extremely sensitive, for diameters higher than 20 mm.

Table 1
Antibacterial activity ZDI (mm) and MIC of honeys at different concentrations against *E. coli* and *P. aeruginosa*.

Honey type	Concentration(%)	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i> .		
		Well	Disc	MIC	Well	Disc	MIC _%
Honey A	10	0	0	56	8	0	90
	30	8	0	>100	0	0	>100
	50	13	19	>100	9	33	>100
	70	12	20	>100	0	0	>100
	100	38	37	96	27	22	91
Honey B	10	0	0	22	10	0	73
	30	12	0	>100	0	0	>100
	50	10	5	>100	10	30	>100
	70	11	18	>100	0	0	>100
	100	31	31	64	30	16	97
Honey C	10	0	0	64	7	0	63
	30	9	0	>100	0	0	>100
	50	1	15	>100	7	28	>100
	70	13	20	>100	0	0	>100
	100	35	32	82	30	22	98
Honey D	10	0	0	81	9	0	90
	30	10	0	>100	0	0	>100
	50	12	19	>100	9	25	>100
	70	17	22	>100	0	0	>100
	100	34	17	97	26	17	94

Table 2 .
Antibiotic susceptibility of *E. coli* and *P. aeruginosa*.

Antibiotic	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Penicillin G	R	R
Ampicillin	R	R
Oxacillin	R	R
Gentamycin	S	I
Chloramphenicol	I	S
Erythromycin	S	I
Tobramycin	S	S

R: resistance; I: intermediately susceptible; S: sensitivity

4. Discussion

The emergence of resistant Gram negative bacteria presents a major challenge for the antimicrobial therapy of infectious diseases and increases the incidence of mortality and morbidity^[15]. Consequently, scientific efforts have been made to study and develop new compounds to be used beyond conventional antibiotic therapy^[16]. The antibacterial activity of honey is dependent on various factors working either singularly or synergistically, the most salient of which are hydrogen peroxide, phenolic compounds, wound pH, pH of honey and osmotic pressure exerted by the honey. Hydrogen peroxide is the major contributor to the antimicrobial activity of honey, and the different concentrations of this compound in different honeys result in their varying antimicrobial effects^[16]. In this study, we attempted to assess the value of honey from different

botanical sources as an antimicrobial therapeutic agent.

The effect of honey on Gram-negative bacteria was explained by Taormina *et al*[17] who attributed it to the presence of hydrogen peroxide and powerful antioxidants, as also to a naturally low pH, which is unsuitable for bacterial growth and to the presence of phenolic acids, lysozyme and flavanoids. Chauhan *et al*[18] reported that the most susceptible bacteria included *E.coli* and *P.aeruginosa* with MIC of honey in the range of 0.625–5.000 mg/mL, and ZDI for the isolates ranged 6.94–35.95 mm, respectively.

AI-Namma[19] also observed that honey has a greater inhibitory effect on Gram negative bacteria. *S. typhi*, *P.aeruginosa*, and *E. coli* are more susceptible than other test organisms, and honey may have potential as therapeutic honeys. Similarly, Wilkinson and Cavanagh[20] compared the activity of 13 honeys at four concentrations (10, 5, 2.5, and 1% v/v) with corresponding dilutions of an artificial honey, a solution containing the principal sugars found in honey and using *E. coli* and *P.aeruginosa* as the test organisms. Nzeako and Hamdi[21] found that *E.coli* and *P. aeruginosa* were inhibited at a concentration of 40% among the studied six commercial honeys.

In the present study, the antibacterial activity was tested using the well and disc-agar diffusion assay and the honey samples were tested at 100, 70, 50, 30 and 10% (v/v) concentration. Most of the honey samples inhibited the growth of *E. coli* and *P. aeruginosa*.

This study provided a sight on the antibacterial activity honey of Algeria and proved that many honeys have the potential for the therapeutic use as antibacterial agents.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

References

- [1] Frey FM, Ryan M. Antibacterial activity of traditional medicinal plants used by Haudenosaunee peoples of New York State. *BMC Complem Altern Med* 2010 ;**10**:64.
- [2] Manisha Deb M, Shyamapada M. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011 ;154–160.
- [3] Kwakman PH. Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria *in vitro* and eradicates skin colonization. *Clin Infect Dis* 2008;**46**:1677–1682.
- [4] Coates A, Hu Y, Bax R, Page C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;**1**:895–910.
- [5] Mohapatra DP, Thakur V, Brar SK. Antibacterial Efficacy of Raw and Processed Honey. *Biotechnol Res Int* 2011; **2011**.
- [6] Saadia MH, Hassan MG, Abdel-Rahman AH. Honey Compared with Some Antibiotics against Bacteria Isolated From Burn-wound Infections of Patients in Ain Shams University Hospital. *J Am Sci* 2010; **6**(10): 301–320.
- [7] Molan PC. The antibacterial activity of honey: the nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992 ;**73**(1): 5–28.
- [8] Hassanain AT, Alyaa AK, Karim AJ. Antimicrobial Effect of Malaysian Honey on Some Human Pathogens: an *in vitro* Study. *Int Med J Malaysia* 2010 ; **9**(2): 15–18.
- [9] Voidarou C, Alexopoulos A, Plessas S, Karapanou A, Mantzourani I, Stavropoulou E et al. Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe* 2011; **17**(6): 375–379.
- [10] Sherlock O, Anthony D, Rahma A, Alice P, Georgina G, Seamus C. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complem Altern Med* 2010;**10**:47.
- [11] Hamouda HM, Marzouk DS. Antibacterial Activity of Egyptian Honey from Different Sources. *Int J Microbiol Res* 2011; **2**(2): 149–155.
- [12] White JW, Subers MH. Studies on honey inhibine. 3. Effect of heat. *J Apic Res* 1964; **3**:45–50.
- [13] Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *J Microbiol Met* 2006; **64**: 84–95.
- [14] Mayrhofer S, Domig KJ, Mair C, Zitz U, Huys G, Kneifel W. Comparison of Broth Microdilution, Etest, and Agar Disk Diffusion Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Lactobacillus acidophilus* Group Members. *Appl Environ Microbiol* 2008; **74**(12):3645–3748
- [15] Molan PC. The antibacterial activity of honey: the nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992; **73**(1): 5–28.
- [16] Tahany HA, Ghada HS, Amal MA. Isolation of Antimicrobial Peptides from *Apis florae* and *Apis carnica* in Saudi Arabia and Investigation of the Antimicrobial Properties of Natural Honey Samples. [Online] Available from: <http://repository.ksu.edu.sa/jspui/handle/123456789/18692>. [cited on April 2011]
- [17] Taormina PJ, Niemira BA, Bauchat LR. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power, *Int J Food Microbiol* 2001; **69**: 217–225.
- [18] Chauhan A, Pandey V, Chacko KM, Khandal RK. Antibacterial activity of raw and processed honey. *Electronic J Biol* 2010; **5**: 58–66.
- [19] AI-Namma RT. Evaluation of *in vitro* inhibitory effect of honey on some microbial isolate. *J Bacteriol Res* 2009; **1**(6): 64–67.
- [20] Willinson JM, Cavanagh HM. Antibacterial activity of 13 honeys against *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Food* 2005; **8**: 100–103.
- [21] Nzeako BC, Hamdi J. Anti microbial potential of honey on some microbial isolates. *J Sci Res Med Sci* 2000; **2**:75–79.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtb



Document heading

Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*

Ahmed Moussa^{1*}, Djebli Noureddine², Hammoudi SM³, Aissat Saad³, Akila Bourabeh³, Hemida Houari³¹Laboratory of Hygiene and Animal Pathology, Institute of Veterinary Sciences University Ibn-KhadounTiaret, Algeria²Departments of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria³Institute of Veterinary Sciences University Ibn-KhadounTiaret, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2011

Received in revised form 9 November 2011

Accepted 3 December 2011

Available online 28 April 2012

Keywords:

Honey

Ginger starch

Antifungal potency

Candida albicans

ABSTRACT

Objective: To evaluate the additive action of ginger starch on the antifungal activity of honey against *Candida albicans* (*C. albicans*). **Methods:** *C. albicans* was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of four varieties of Algerian honey. Lower concentrations of honey than the MIC were incubated with a set of concentrations of starch and then added to media to determine the minimum additive inhibitory concentration (MAIC). **Results:** The MIC for the four varieties of honey without starch against *C. albicans* ranged between 38% and 42% (v/v). When starch was incubated with honey and then added to media, a MIC drop was noticed with each variety. MAIC of the four varieties ranged between 32% honey (v/v) with 4% starch and 36% honey (v/v) with 2% starch. **Conclusions:** The use of ginger starch allows honey benefit and will constitute an alternative way against the resistance to antifungal agents.

1. Introduction

Fungal diseases represent a critical problem to health and they are one of the main causes of morbidity and mortality worldwide[1,2]. *Candida albicans* (*C. albicans*) is the most common species associated with candidiasis and is the most frequently recovered species from hospitalized patients[3–5]. The treatment of mycoses has lagged behind bacterial chemotherapy and fewer antifungal than antibacterial substances are available[6,7]. Therefore, a search for new antifungal drugs is extremely necessary[8–10]. Different natural substances are responsible for antifungal action[11–13]. Among the possible alternatives, products from the hive such as honey, which is considered as natural, non toxic and with a broad spectrum of action, mainly because of its antimicrobial role, are used[14]. This could be promising alternative to substitute synthetic antifungal agent but in

several countries the cost of honey is quite expensive which limits its use. Starch is a principal constituent of many foods and it does not only constitute a major energy source, but also is essential to the gross texture or consistency of many food preparations[15]. Therefore, the study was aimed to evaluate the additive action of ginger starch on the antifungal activity of honey against *C. albicans*.

2. Materials and methods

2.1. Honey sample and plant

From the 2009 harvest, four varieties of honeys of different botanical origin, namely: citrus (V1), jujube (V2), orange (V3) and multi floral (V4) were collected from hives located in western Algeria. All honeys were kept in glass vials and protected from light at temperature of 4 °C.

Rhizome of ginger (*Zingiber officinale*) purchased from local market of Tiaret (western of Algeria) was peeled and crushed using a hammer mill and then diluted in water. Obtained milk was sieved and sediment was separated from the supernatant and washed several times. The deposit obtained was spread out on aluminum foil and dried at 45 °C for 48 h. Obtained

*Corresponding author: Ahmed Moussa, Laboratory of Hygiene and Animal Pathology, Institute of Veterinary Sciences University IbnKhadounTiaret, Algeria.

Tel: +213 65234059

Fax: +213 46 425001

E-mail: moussa7014@yahoo.fr

Foundation Project: This work was financially supported by project CNEPRU, Institute of Veterinary Sciences, University Ibn-Khadoun (TIARET), Algeria (grant No. F023 2009/0009).

product was crushed to get starch powder^[16] from which various concentrations were prepared and expressed as percentage (%).

2.2. Fungal strain and inoculums standardization

C. albicans (Institut Pasteur of Algiers) was maintained by subculture in specific media (Sabouraud agar). The inoculum suspension was obtained by taking five colonies (>1 mm diameter) from 24 old cultures grown on Sabouraud agar. The colonies were suspended in 5 mL of sterile saline water (0.85%). The inoculum suspensions were shaken for 15 sec and density was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland standard (equivalent to $1-5 \times 10^6$ cfu/mL).

2.3. Minimum inhibitory concentration (MIC)

Increased concentrations (10%–50% v/v) were incorporated into media to test their efficiency against *C. albicans*. Each plate with final volume of honey and media of 5 mL was inoculated and incubated at 37 °C for 48 h. The MIC was determined by finding the plates with the lowest concentration of honey on which the strain would not grow. All MIC values were expressed in % (v/v).

2.4. Minimum additive inhibitory concentration (MAIC)

To evaluate the effect of starch on the antifungal action of honey, 1% starch solution was prepared using sterile water. Different volumes from the stock solution were added to a range of honey concentrations lower than the MIC. The same volume of starch solution that has given inhibition with honey was added alone to media as control to check whether or not starch alone has an inhibition effect against *C. albicans*. An equivalent volume of water was added to honey instead of starch solution to confirm that additive inhibition is not due to the dilution of honey. The final volume in each plate was 5 mL. Starch content in media ranged between 1% and 8% (w/v). Honey and starch as well as honey and water were incubated for 24 h at 37 °C before being incorporated into media. Plates were inoculated and incubated at 37 °C for 48 h. All inoculations were carried out in duplicates.

3. Results

The inhibitory action was seen neither in the media containing starch only nor in media with water and starch. All varieties of honey were effective against the tested strain. Without starch of ginger, the MIC of the four varieties ranged between 38% and 42% (v/v). When starch was incubated with honey and added to media, a MIC drop was noticed with each variety and the MAIC of the four varieties ranged between 32% and 36% (v/v) (Table 1).

Table 1
MIC, MAIC and MIC drop of tested honeys.

Honey varieties	MIC values [% (v/v)]			MAIC values [% (v/v)] honey and starch								MIC drop (%)
	Honey	Starch	Water and starch	Starch solution								
				1%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	
V1	42	0	0	42	36	36	36	36	36	36	36	14.28
V2	41	0	0	41	41	41	35	35	35	35	35	14.63
V3	38	0	0	38	38	38	32	32	32	32	32	15.78
V4	39	0	0	39	39	39	33	33	33	39	39	15.38

4. Discussion

In humans, fungal infections range from superficial to deeply invasive or disseminated, and have increased dramatically in recent years^[6]. The application of honey in medicine has recently been rediscovered and it is gaining acceptance as an antibacterial agent for the treatment of ulcers, wounds, and other surface infection^[17].

Using corn starch and four varieties of Algerian honeys^[18] has shown an additive effect against *C. albicans* with the MIC values of 38% and 28%, respectively, with a starch concentration of 3.6%. In a previous study, Boukraa *et al*^[19] used other five varieties of honey and the same strain of *C. albicans* used in present study, and obtained a MIC value ranging between 30% (starch 2.6%) and 39% (starch 2.4%). Amylases present in honey were expected to split

starch chains to randomly produce dextrin and maltose and probably increase the osmotic effect in the media by increasing the amount of sugars and consequently increase the antifungal activity. As a paradox, the variety with the lowest diastase number has shown the highest MIC drop and the variety with the highest diastase number has shown the lowest MIC drop. Resistant starch has received much attention for both its potential health benefits and functional properties. It has properties similar to fiber and shows promising physiological benefits in humans, which may result in disease prevention^[20]. Eerlingen *et al*^[21] reported that an increase in resistant starch yield was observed with high-amylose corn starch. As the final purpose of our future studies is the use of honey and starch to manage superficial mycoses by an increase in osmotic pressure, the use of resistant starch is not adequate in this case. In previous studies, the same varieties of honey and ginger were used.

We obtained a MIC drop with *Aspergillus niger* ranging

between 10.5% and 11.5%^[22]. By using 1% ginger starch solution instead of 10% corn starch used in the above mentioned studies, we obtained better results. But it must be mentioned that the honey varieties used by Boukraa^[18] and Boukraa *et al*^[19] were different from ours. It then seems that ginger starch for a reason or another is more effective than corn starch, perhaps in regard to its lesser resistance to hydrolysis by amylases. In other hand, Torley *et al*^[23] reported that, honeys from different yields were observed with high-amylose corn starch. The experiments showed that the differences in gelatinization temperature, lipid content, and apparent amylose content of the two starches were not the main causes of the different impact of sugars on resistant starch yields. Sources show a varied effect on starch gelatinization with starch viscosity increasing with addition level for some honeys, but decreasing with increasing addition level for other samples. Neither honey nor starch has adverse effects on tissues, so they can be safely used in wounds and inserted in cavities and sinuses to clear infection. A clinical trial would be carried out to validate these findings. The results will enable a systematic study of many varieties of honey on pathogens yeast with increased resistance opposite conventional anticandidiasis.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors are thankful to staff of Tiaret University for providing material.

References

- [1] Marg KSK. *The wealth of India*. New Delhi: National Institute of Science Communication and Information Resources; 1998, p. 164.
- [2] Meena AK, Ramanjeet K, Brijendra S, Yadav AK, Uttam S, Ayushy S, et al. Review on antifungal activities of Ayurvedic medicinal plants. *Drug Invent Today* 2010; **2**(2): 146–148.
- [3] Amit KT, Anushree M. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement Altern Med* 2010; **10**: 65.
- [4] Henry-Staney MJ, Gami RM, Johnson MA, Bendel CM, Wells CL. Comparative abilities of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to colonize and translocate from the intestinal tract of antibiotic-treated mice. *Microb Ecol Health Dis* 2005; **17**: 129–137.
- [5] Sobel JD, Fisher JF, Kauffman CA, Newman CA. *Candida* urinary tract infections—epidemiology. *Clin Infect Dis* 2011; **52**(Suppl 6): S433–S436.
- [6] Duraipandiyar V, Ignacimuthu S. Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu, India. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; **1**(Suppl 2): S204–S215.
- [7] Duraipandiyar V, Ignacimuthu S. Antifungal activity of rhein isolated from *Cassia fistula* L. flower. *Pharmacology* 2010; **1**(9): WMC00687.
- [8] Fortes TO, Alviano DS, Tupinamba G, Padron TS, Antonioli AR, Alviano CS, et al. Production of an antimicrobial substance against *Cryptococcus neoformans* by *Paenibacillus brasiliensis* Sa3 isolated from the rhizosphere of *Kalanchoe brasiliensis*. *Microbiol Res* 2008; **163**: 200–207.
- [9] Basma AA, Zuraini Z, Sasidharan S. A transmission electron microscopy study of the diversity of *Candida albicans* cells induced by *Euphorbia hirta* L. leaf extract *in vitro*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; **1**: 20–22.
- [10] Sharma KK, Saikia R, Kotoky J, Kalita JC, Devi R. Antifungal activity of *Solanum melongena* L, *Lawsonia inermis* L. and *Justicia gendarussa* B. against dermatophytes. *Int J PharmTech Res* 2011; **3**(3): 1635–1640.
- [11] Koç AN, Silici S, Kasap F, Hörmet-Oz HT, Mavus-Buldu H, Ercal BD. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. *J Med Food* 2011; **14**(1–2): 128–134.
- [12] Manila C, Barbara C, Giuseppe D, Manuela B, Augusto A, Elena P. Honey flavonoids, natural antifungal agents against *Candida albicans*. *Int J Food Prop* 2011; **14**: 799–808.
- [13] Supreetha S, Sharadadevi M, Simon SP, Jain J, Tikare S, Amit M. Antifungal activity of ginger extract on *Candida albicans*: an *in-vitro* study. *J Dent Sci Res* 2011; **2**(2): 1–5.
- [14] Muhrbeck P, Svensson E. Annealing properties of potato starch with different degrees of phosphorylation. *Carbohydr Polym* 1996; **31**: 263–267.
- [15] Kevate BN, Chavan UD, Kadam SS, Chavan JK, Amarowicz R. Isolation and characterization of starch from moth bean. *Afr J Food Sci Technol* 2010; **1**(3): 68–70.
- [16] Amani NG, Aboua F, Gnakri D, Kamenan A. Study of physico-chemical properties of cocoyam starch (*Xanthosoma sagittifolium*). *Ind Aliment Agric* 1993; **110**(3): 136–142.
- [17] Adewumi AA, Ogunjinmi AA. The healing potential of honey and propolis lotion on septic wounds. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; **1**(Suppl 1): S55–S57.
- [18] Boukraa L. Additive action of honey and starch against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. *Rev Iberoam Micol* 2007; **24**: 309–311.
- [19] Boukraa L, Hama B, Ahmed M. Synergistic action of starch and honey against *Candida albicans* in correlation with diastase number. *Braz J Microbiol* 2008; **39**: 40–43.
- [20] Sajilata MG, Rekha SS, Pushpa RK. Resistant starch—a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2006; **5**(1): 1–17.
- [21] Eerlingen RC, Van den Broeck I, Delcour JA, Levine H. Enzyme resistant starch. Influence of sugars on resistant starch formation. *Cereal Chem* 1994; **6**(70): 345.
- [22] Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Aggad H, Boucif A. Antifungal activity of a combination of Algeria honey and starch of ginger against *Aspergillus niger*. *Int J Microbiol Res* 2011; **2**(3): 263–266.
- [23] Torley PJ, Rutgersb RPC, D’Arcya B, Bhandaria BR. Effect of honey types and concentration on starch gelatinization. *LWT—Food Sci Technol* 2004; **37**: 161–170.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtb



Document heading

Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp.

Ahmed Moussa^{1*}, Djebli Noureddine², Aissat Saad¹, Meslem Abdelmelek¹, Benhalima Abdelkader³¹Institute of Veterinary Sciences University, Ibn-khaldoun Tiaret (14000), Algeria²Department of Biology, Faculty of Sciences, Mostaganem University, Algeria³Laboratory Science and Technology Environment and Development, Mostaganem University, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2011

Received in revised form 27 April 2011

Accepted 28 June 2011

Available online 28 June 2011

Keywords:

Honey

Antifungal activity

*Candida albicans**Rhodotorula* sp.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast *i.e.* *Candida albicans* (*C. albicans*) and *Rhodotorula* sp. **Methods:** Four Algeria honeys of different botanical origin were analyzed to test antifungal effect against *C. albicans*, and *Rhodotorula* sp. Different concentrations (undiluted, 10%, 30%, 50% and 70% w/v) of honey were studied *in vitro* for their antifungal activity using *C. albicans* and *Rhodotorula* sp. as fungal strains. **Results:** The range of the diameter of zone of inhibition of various concentrations of tested honeys was (7–23 mm) for *Rhodotorula* sp., while *C. albicans* showed clearly resistance towards all concentrations used. The MICs of tested honey concentrations against *C. albicans* and *Rhodotorula* sp. were (70.09–93.48)% and (4.90–99.70)% v/v, respectively. **Conclusions:** This study demonstrates that, *in vitro*, these natural products have clearly an antifungal activity against *Rhodotorula* sp.

1. Introduction

The increase in the resistance of antifungal drugs in use has attracted the attention of the scientific community. *Candida albicans* (*C. albicans*) is a dimorphic organism that commonly inhabits in oral and vaginal mucosa and gastro-intestinal tract of human beings as one of the commensal organisms[1–4]. In addition to *C. albicans*, *Rhodotorula* sp. has been implicated as the etiologic agent of central venous catheter infection and fungemia[5–9]. In recent years, there has been an increasing search for new antifungal compounds due to the lack of efficacy, side effects and or resistance associated with some of the existing drugs[10–12]. Recently, the potential antifungal effect of honey has attracted serious attention within the scientific community[13–16]. Most types of honey generate hydrogen peroxide when diluted because of the activation of the

enzyme glucose oxidase, which oxidizes glucose to gluconic acid and hydrogen peroxide[17,18]. Hydrogen peroxide is the major contributor to the antimicrobial activity of honey, and the different concentrations of this compound in different honeys result in their varying antimicrobial effects[19–22]. The *in vitro* antifungal activity of honey was reported by Maria *et al*[23], who observed that honey stops the growth of *C. albicans*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*. Obaseik–Ebor and Afongo[24] compared the antifungal activity of honey distillate with some antimycotic preparations against *C. albicans* and found that all the strains resistant to conventional antimycotic agents are inhibited by the active fraction of honey distillate.

However, only limited data are available on the susceptibility of *Rhodotorula* sp. to antifungal and antiseptic agents[25,26]. This study was aimed to confirm the usage of Algeria honey as antifungal and antiseptic agents and evaluate this inhibitory action at different honey concentration against *C. albicans* and *Rhodotorula* sp.

2. Materials and methods

2.1. Honey samples

*Corresponding author: Ahmed Moussa, Institute of Veterinary Sciences University, Ibn-Khaldoun Tiaret (14000), Algeria.

Tel: +213 65234059

Fax: +213 46 425001

E-mail: moussa7014@yahoo.fr.

Foundation Project: This work was financially supported by project CNEPRU, Institute of Veterinary Sciences (IVS), University Ibn-Khaldoun (TIARET), Algeria (grant No. F023 2009/0009).

During the 2011 flowering seasons, four honey samples were gathered and provided by various bee-keepers from two different areas of the western Algeria. These honey samples were aseptically collected in sterile screwed cups and kept in a cool and dry place (at room temperature) overnight before they were finally transported to the laboratory.

2.2. Preparation of honey solutions

Honey solutions were prepared immediately prior to testing by diluting honey to the required concentrations (undiluted, 10%, 30%, 50%, and 70%, w/v). All samples were then incubated for 30 min at 37 °C in a shaking water bath that allowed aeration of the solutions. Incubation was carried out in the dark because both hydrogen peroxide and glucose oxidase are light sensitive[27].

2.3. Yeast strains and susceptibility testing

Yeasts were maintained on Sabouraud dextrose agar (SDA; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 4 °C, and sub cultures were performed prior to each experiment in the same medium for 48 h at 35 °C. Turbidity standard and preparation of inocula: stock fungal inoculum suspensions were prepared in sterile saline from 48 h cultures on SDA at 35 °C. Each suspension was adjusted visually to 0.5 McFarland turbidity standard. Dilutions of these suspensions were subcultured on SDA to determine the number of CFU/mL. The adjusted inoculum was $1 \times 10^7 - 5 \times 10^7$ CFU/mL.

2.4. Antifungal assay

Three different methods were used to evaluate the antifungal activity of honey: disc diffusion, well and spectrophotometric methods[28].

Antifungal activity of honey was evaluated using agar disc diffusion method against test microorganisms. About 100 µL of fresh culture suspension of the test microorganisms was spread on the respective media Sabouraud dextrose agar plates. The concentration of cultures was 1×10^7 CFU/mL. For screening,

sterile filter paper discs (5 mm diameter) were impregnated with 10 µL of honey equivalent to 0.1 mg of honey after being placed on the surface of the inoculated media agar plates. The plates were stood at 4 °C for 2 h before being incubated under optimum conditions at 37 °C for 24 h. Clear inhibition zones around the discs indicated the presence of antimicrobial activity. The diameters of the inhibition zones were measured in millimeter, including the diameter of disc. The controls were set up with equivalent quantities of water.

The agar well diffusion method was employed. The honey samples were first inoculated separately on standard nutrient media with no test organisms so as to evaluate their possible contamination. Thereafter, solidified nutrient agar plates were separately flooded with the liquid inoculums of the different test organisms using the spread plate method. The plates were drained and allowed to dry at 37 °C for 30 min after which four equidistant wells of 5 mm in diameter were punched using a sterile cork borer at different sites on the plates. About 50 µL of the different concentrations (undiluted, 30%, 50% and 70% w/v) of the honey samples were separately placed in the different punched wells with 1 mL sterile syringe. The plates were allowed to stay for 15 min for pre-diffusion to take place followed by an overnight incubation that lasted for 24 h at 37 °C. The diameter of inhibition zones, including the diameter of the well, was recorded. Each assay was carried out in triplicate.

2.5. Minimum inhibitory concentration (MIC) determination

Concentrations of honey suspensions (undiluted, 10%, 30%, 50% and 70%) were incorporated into media to test their efficiency against *C. albicans* and *Rhodotorula* sp. Each plate reaching final volume of 5 mL including both honey and media was inoculated and incubated at 37 °C for 48 h. The MIC was determined by finding the plates with the lowest concentration of honey on which the strain would not grow. All MIC values were expressed in % (v/v).

3. Results

Table 1 showed the inhibition zone sizes produced by

Table 1
Antifungal activity of honey at different concentrations against *C. albicans* and *Rhodotorula* sp.

Yeast strains	Honey dilution	Inhibition zone diameter (mm)							
		Disc diffusion method				Well diffusion method			
		Honey A	Honey B	Honey C	Honey D	Honey A	Honey B	Honey C	Honey D
<i>C. albicans</i>	Undiluted	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	70%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	30%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	50%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	10%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Rhodotorula</i> sp.	Undiluted	9	8	10	8	22	20	23	14
	70%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	30%	9	8	11	9	13	10	11	8
	50%	13	10	10	7	15	14	18	17
	10%	8	8	7	7	12	11	10	11

ND: No inhibition was detected.

Table 2
MIC of honey at different concentrations against *C. albicans* and *Rhodotorula* sp.

Honey concentrations	<i>C. albicans</i> MIC _% (v/v)				<i>Rhodotorula</i> sp. MIC _% (v/v)			
	Undiluted	50% (v/v)	25% (v/v)	12.5% (v/v)	Undiluted	50% (v/v)	25% (v/v)	12.5% (v/v)
Honey A	81.16	70.09	>100.00	>100.00	87.30	96.37	25.04	>100.00
Honey B	91.36	73.94	>100.00	>100.00	89.76	94.63	43.56	>100.00
Honey C	93.48	75.18	>100.00	>100.00	56.14	99.70	5.65	>100.00
Honey D	84.30	79.27	>100.00	>100.00	94.12	80.50	4.90	>100.00

various honeys at different dilutions. The diameters of zone of the inhibition of honey with various concentrations tested for *Rhodotorula* sp. ranged from 7 to 13 mm and 8 to 23 mm for disc and well diffusion method, respectively. While *C. albicans* showed resistance towards all honey concentrations used by both methods. The MIC ranges of the tested honey concentrations were (70.09–93.48) and (4.90–99.70)% v/v against *C. albicans* and *Rhodotorula* sp., respectively (Table 2).

4. Discussion

The conventional treatment of fungal disease is limited, and part of the reason is due to the limited spectrum of the currently antifungal drugs, and the expensive treatment, particularly due to the need of prolonged therapy. In recent years, several studies on the *in vitro* susceptibility of superficial mycoses to antifungal drugs have been done and the results have shown considerable variations[29,30]. Thus, nowadays many researches are focused on the therapeutical properties of natural compounds[31]. Honey is a natural product that is used for its antifungal activity[14]. Several factors may influence the antifungal activity of honey. For example, DeMera and Angert[32] reported that honeys from different phytogeographic regions vary in their ability to inhibit the growth of yeasts, suggesting that botanical origin plays an important role in influencing the antifungal activity. In addition, there are a great variety of components, including phenolic acids, flavonoids and other biomolecules, in different honeys. Biological activity of honey is mainly attributed to the phenolic compounds reported by Estevinho *et al*[33]. In fact, the antimicrobial action of phenolics is well known and it is related to their ability to denature proteins, being generally classified as surfaceactive agents. Xesus and Maria[34] suggest that the honey mechanism for fungal growth inhibition is not related to the osmotic shock derived from the presence of sugar in the culture medium. Moreover, Wahdan[35] stated that high sugar concentration in honey leads to the high osmolarity that produces antimicrobial activity. Additionally, he found no inhibitory activity of the sugar solutions against *Trichophyton mentagrophytes* and *C. albicans* and noted that fungi are generally much more tolerant than bacteria to the high osmotic effect. Diekema *et al*[36] reported the *in vitro* activities of 8 antifungals against 64 *Rhodotorula* isolates. *Rhodotorula* strains were resistant

in vitro to fluconazole (MIC₅₀, 1128 mg/ mL) and caspofungin (MIC₅₀, 18 mg/mL). In the present study, *Rhodotorula* sp. was susceptible to honey since growth inhibition was reached at the minor level. Honey samples inhibited completely the growth of *Rhodotorula* sp.

Our results showed that undiluted honey was able to inhibit the growth of many species of *Rhodotorula* sp. but there was no effect on *C. albicans*. Al-Waili[37] found that honey concentration ranging from 30% to 50% inhibits the growth of several pathogenic microorganisms, including *C. albicans*. Irish *et al*[6] reported antifungal efficacy of various honeys against clinical isolates of *C. albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida dubliniensis*. Khosravi *et al*[38] reported that honey has antifungal activity against *Candida* species such as *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata*, and *Candida dubliniensis*. The results of this preliminary study demonstrated that Algeria honey is an effective inhibitor of *Rhodotorula* sp.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors thank staff of Tiaret University for providing materials.

References

- [1] Arra BA, Zakaria Z, Sreenivasan S. A transmission electron microscopy study of the diversity of *Candida albicans* cells induced by *Euphorbia hirta* L. leaf extract *in vitro*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011; **1**: 20–22.
- [2] Cristina SM, José PM. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*—similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* 2001; **4**(2): 214–221.
- [3] Gloria M, Rosalía DO, Federico NG, Lucía M, Jesús P, Concha G, et al. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol* 1998; **1**: 95–106.
- [4] Dean DA, Burchard KW. Surgical perspective on invasive

- Candida* infections. *World J Surg* 1998; **22**: 127–134.
- [5] Kiehn E, Gorey E, Brown AE, Edwards FF, Armstrong D. Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. *Clin Infect Dis* 1992; **14**: 841–846.
- [6] Tuon FF, Costa SF. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Rev Iberoam Micol* 2008; **25**: 135–140.
- [7] Samonis G, Anatoliotaki M, Apostolou H, Maraki S, Mavroudis D, Georgoulis V. Transient fungemia due to *Rhodotorula rubra* in a cancer patient: case report and review of the literature. *Infection* 2001; **29**: 173–176.
- [8] Tuon FF, de Almeida GM, Costa SF. Central venous catheter-associated fungemia due to *Rhodotorula* spp.—a systematic review. *Med Mycol* 2007; **45**: 441–447.
- [9] Rusthoven JJ, Feld R, Tuffuell PJ. Systemic infection by *Rhodotorula* spp. in the immunocompromised host. *J Infect* 1984; **8**: 241–246.
- [10] Intzar A, Farrah GK, Krishan AS, Bishan DG, Naresh KS, Prabhu D, et al. *In vitro* antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010; **9**: 7.
- [11] Klepser ME. *Candida* resistance its clinical relevance. *Pharmacotherapy* 2006; **26**: 68S–75S.
- [12] Barker KS, Rogers PD. Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. *Curr Infect Dis Rep* 2006; **8**: 449–456.
- [13] Ahmed M, Djebli N, Aissat S, Hammoudi SM, Bourabeh A, Hemida H. Additive potential of ginger starch on antifungal potency of honey against *Candida albicans*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(1): 253–255.
- [14] Irish J, Carter DA, Shokohi T, Blair S. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Med Mycol* 2006; **44**: 289–291.
- [15] Cancliracci M, Citterio B, Piatti E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chem* 2012; **131**(2): 493–499.
- [16] Khosravi AR, Shokri H, Katirae F, Ziglari T, Forsi M. Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. *J Apic Res* 2008; **47**(8): 256–260.
- [17] White JW, Subers MH, Schepartz AI. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim Biophys Acta* 1963; **73**: 57–70.
- [18] Bang LM, Bunting C, Molan PC. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *J Altern Complement Med* 2003; **9**(2): 267–273.
- [19] Molan PC. The antibacterial nature of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 1992; **73**(1): 5–28.
- [20] Cooper RA, Halas E, Molan PC. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burn Care Rehabil* 2002; **23**: 366–370.
- [21] Basualdo C, Sgro V, Finola MS, Juam M. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Vet Microbiol* 2007; **124**: 375–381.
- [22] Adeleke OE, Olaitan JO, Okekepe EI. Comparative antibacterial activity of honey and gentamicin against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Burns Fire Disasters* 2006; **19**: 201–204.
- [23] Maria LE, Afonso SE, Xesús F. Antifungal effect of lavender honey against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*. *J Food Sci Technol* 2011; **48**(5): 640–643.
- [24] Obaseiki-Ebor EE, Afonya TCA. *In vitro* evaluation of the anticandidiasis activity of honey distillate (HY-I) compared with that of some antimycotic agents. *J Pharm Pharmacol* 1984; **36**: 283–284.
- [25] Kiehn TE, Gorey E, Brown AE, Edwards FE, Armstrong D. Sepsis due to *Rhodotorula* related to use of indwelling central venous catheters. *Clin Infect Dis* 1992; **14**: 841–846.
- [26] Galan-Sanchez F, Garcia-Martos P, Rodriguez-Ramos C, Marin-Casoava P, Mira-Gutierrez J. Microbiological characteristics and susceptibility patterns of strains of *Rhodotorula* isolated from clinical samples. *Mycopathologia* 1999; **145**: 109–112.
- [27] White JW, Subers MH, Schepartz AI. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim Biophys Acta* 1963; **73**: 57–70.
- [28] Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *J Microbiol Methods* 2006; **64**: 84–95.
- [29] Jessup CJ, Warner J, Isham N, Hasan I, Channoum MA. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 341–344.
- [30] Grupta AK, Sauder DN, Shear NH. Antifungal agents: an overview Part II. *J Am Acad Dermatol* 1994; **30**: 911–933.
- [31] Ji HF, Li XJ, Zhang HY. Natural products and drug discovery. *EMBO Rep* 2009; **10**: 194–200.
- [32] DeMera JH, Angert ER. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phylogeographic regions of Costa Rica. *Apidologie* 2004; **35**: 411–417.
- [33] Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compound extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol* 2008; **46**: 3774–3779.
- [34] Xesús F, Estevinho ML. A survey of the *in vitro* antifungal activity of *Heather* (*Erica* sp.) organic honey. *J Med Food* 2011; **14**: 1–5.
- [35] Wahdan HAL. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* 2008; **1**: 26–31.
- [36] Diekema DJ, Petroelje B, Messer SA, Hollis RJ, Pfaller MA. Activities of available and investigational antifungal agents against *Rhodotorula* species. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 476–478.
- [37] Al-Waili N. Therapeutic and prophylactic effects of crude honey on chronic seborrheic dermatitis and dandruff. *Eur J Med Res* 2001; **6**: 306–308.
- [38] Khosravi AR, Shokri H, Katirae F, Taherel F. Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. *J Apic Res* 2008; **47**: 256–260.

Résumé :

La recherche de produits naturels aux propriétés biologiques est d'une grande importance dans le domaine médical. Dans ce contexte, le miel constitue une source potentielle de ce type de produits. Jusqu'à présent, très peu d'études portant sur la caractérisation du miel Algérien ont été réalisées. Nous avons débuté notre travail par la détermination de l'origine botanique ainsi que la composition physico-chimique de dix (10) échantillons des miels de l'ouest algérien. La quantification des phénols et flavonoïdes totaux a été réalisée en utilisant respectivement la méthode de Folin-Ciocalteu et celle à l'hydroxyde d'aluminium. L'évaluation des propriétés antioxydantes a été effectuée par deux techniques couramment utilisées : piégeage du radical DPPH et réduction de fer (FRAP). L'activité inhibitrice a été évaluée sur des bactéries (Gram+ et Gram-) et deux levures selon quatre méthodes (Puits, disques, spectrophotomètre et incorporation en gélose). Cette activité a été comparée à celle des antibiotiques de synthèse. Enfin l'effet additif avec l'amidon de pomme de terre et l'amidon de curcuma a été évalué. Parmi les 10 échantillons testés, 4 sont des miels unifloraux et 6 multifloraux. L'analyse méliissopalynologiques a révélé trois miels unifloraux soit, Eucalyptus, Citrus et jujubier, tandis que les miels multifloraux sont à dominance Astéracées et Rhamnacées. Les résultats des paramètres physico-chimiques montrent que tous les miels répondent aux normes internationales. La quantification des phénols et flavonoïdes totaux montre la richesse des miels en polyphénols dont la teneur varie entre $63,93 \pm 0,11$ et $128,87 \pm 0,97$ mg acide gallique équivalent (EAG)/ 100 g miel, et en flavonoïdes exprimées en équivalent catéchine (EC) sont de l'ordre de $5,41 \pm 0,04$ à $21,77 \pm 0,46$ mg EC/ 100g. Tous les miels étudiés se sont avérés dotés des propriétés antioxydantes concluantes. Pour les quatre méthodes utilisées les bactéries Gram + se sont révélées plus sensibles à l'action du miel que les Gram-. Pour ce qui est des levures, *Candida albicans* s'est révélée insensible en regard de deux techniques (disques et puits), alors que cette inhibition était marquée par la méthode du spectre (70,09% - 93,48%). *Rhodotorula sp.* s'est montré de légèrement sensible (5,65%) à hautement sensible (99,7%). l'effet additive avec les deux types d'amidon s'est révélé concluant.

Mots clés : Miel/ Algérie/Composition physico-chimique /Effet antioxydant/ Propriétés antimicrobiennes