

LAPPEENRANNAN TEKNILLINEN YLIOPISTO  
Teknillinen tiedekunta  
LUT Kemianteeniikka  
Kandidaatintyö  
Kevät 2016

## **Suomalaisten marjojen fenolihdisteet ja niiden stabiilisuus prosessoinnin ja säilytyksen aikana**

Tekijä: Satu Salin

Ohjaaja: TkT Jari Heinonen

## TIIVISTELMÄ

Satu Salin

Suomalaisten marjojen fenolihdisteet ja niiden stabiilisuus prosessoinnin ja säilytyksen aikana

44 sivua, 14 kuvaa, 4 taulukkoa

Lappeenrannan teknillinen yliopisto

Kemiantekniikan koulutusohjelma

Kandidaatintyö

Hakusanat: marjat, fenolihdisteet, stabiilisuus, prosessointi, säilytys

Suomalaiset marjat sisältävät huomattavia määriä erilaisia fenolihdisteitä ja ne ovat siksi erinomaisia fenolihdisteiden lähteitä moniin muihin elintarvikkeisiin verrattuna. Fenolihdisteet ovat kasveissa syntyviä aineenvaihduntatuotteita, joilla on todettu olevan terveyden kannalta positiivisia vaikutuksia. Ne antavat kasvikunnan tuotteille niiden tunnusomaisen värin sekä toimivat suoja-aineina taudinaiheuttajia vastaan.

Erityisesti elintarvike-, lääke- ja kosmetiikkateollisuus jalostavat marjoja erilaisiksi lopputuotteiksi. Fenolihdisteet tuovat näihin tuotteisiin hyödyllisiä terveysvaikutuksia ja ne voivat toimia niissä myös väripigmenteinä. Fenolihdisteet ovat kuitenkin suhteellisen epästabiileja yhdisteitä. On havaittu, että prosessointi- ja säilytystavat vaikuttavat huomattavasti niiden stabiilisuuteen ja hajoamiseen. Tämän kandidaatintyön tavoitteena oli selvittää fenolihdisteiden stabiilisuuteen vaikuttavia tekijöitä prosessoinnin ja säilytyksen aikana kirjallisuuden pohjalta.

Tämän työn tulosten perusteella marjojen prosessointi kannattaa suorittaa mahdollisimman lyhyessä ajassa matalissa lämpötiloissa, sillä monet fenolihdisteistä eivät ole pitkään lämpöstabiileja. Säilytys kannattaa tehdä myös matalissa lämpötiloissa, pitkänä säilytysaikana pakastettuna. Korkea pH vaikuttaa usean fenolihdisteiden hajoamiseen ja se saattaa aiheuttaa tuotteissa värinmuutoksia. Valo, hapen läsnäolo sekä erilaiset muut yhdisteet voivat vaikuttaa heikentävästi fenolihdisteiden stabiilisuuteen sekä prosessoinnin että säilytyksen aikana. Fenolihdisteiden stabiilisuus on hyvin rakennekohtaista ja siksi prosessoinnin ja säilytyksen tarkkojen vaikutusten yleistäminen kaikkiin fenolihdisteisiin on vaikeaa.

## **ABSTRACT**

Satu Salin

Phenolic compounds in Finnish berries and their stability during processing and storage

44 pages, 14 pictures, 4 tables

Lappeenranta University of Technology

Chemical engineering

Bachelor's thesis

Keywords: berries, phenolic compounds, stability, processing, storage

Finnish berries are rich in many different phenolic compounds which are secondary plant metabolites. Phenolic compounds are strong antioxidants and they have been proven to be very health effective. Compared to numerous other food items berries have the largest amount of phenolic compounds in plants.

Phenolic compounds are strongly affected by processing and storage conditions because they are rather unstable. It is important to take this into consideration during processing and storage of different kinds of berry products. The aim of this bachelor's thesis was to find factors that influence phenolic compound's stability during processing and storage through a literature survey.

This study shows that with respect to phenolic compounds the best way is to do the processing of the berries in a low temperature during a short period of time. Storage should also be done in low temperature or frozen. High pH, light, oxygen, and different kinds of other compounds present in the extracts may also cause degradation of the phenolic compounds during both processing and storage. The chemical structure of the phenolic compound also has a profound effect on the phenolic compound stability. Thus is hard to generalize how stable all of the phenolic compounds are in different processing and storage conditions.

## SISÄLLYSLUETTELO

1	Johdanto.....	5
2	Materiaalit ja menetelmät .....	6
3	Fenoliyhdisteet.....	7
3.1	Jaottelu .....	8
3.1.1	Antosyaanit.....	8
3.1.2	Flavonolit.....	10
3.1.3	Flavanolit.....	11
3.1.4	Fenolihapot.....	12
3.1.5	Ellagitanniinit .....	13
3.1.6	Proantosyanidiinit.....	14
3.2	Terveysvaikutukset.....	15
3.3	Pitoisuudet suomalaisissa marjoissa.....	18
4	Fenoliyhdisteiden talteenotto.....	22
4.1	Uuttaminen marjoista .....	22
4.2	Erotus ja puhdistus .....	22
4.2.1	Adsorptio .....	23
4.2.2	Teolliset erotusprosessit .....	24
5	Fenoliyhdisteiden stabiilisuus.....	26
5.1	Stabiilisuus prosessoinnin aikana.....	26
5.1.1	Lämpökäsittely .....	27
5.1.2	Entsyymit.....	30
5.1.3	pH .....	31
5.2	Stabiilisuus säilytyksen aikana.....	32
5.2.1	Säilytyksen lämpötila .....	33
5.2.2	Säilytyksen pituus.....	35
5.2.3	Valo .....	35
5.2.4	Värimuutokset .....	36
6	Yhteenvedo fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen vaikuttavista tekijöistä .....	37
7	Johtopäätökset.....	39
	LÄHDELUETTELO .....	40

## 1 Johdanto

Fenolihdisteitä esiintyy erityisesti kasveissa ja ne ovat terveysvaikutustensa takia kiinnostavia yhdisteitä. Ne toimivat erityisesti vahvoina antioksidanteina, mutta niihin on liitetty myös monia muita terveysvaikutuksia (Tuomela *et al.*, 2013). Fenolihdisteiden pitoisuudet ovat korkeita etenkin marjoissa (Mattila & Törrönen, 2006). Suomen luonto tarjoaa suuren valikoiman erilaisia marjoja, joista voidaan jalostaa esimerkiksi erilaisia elintarvikkeita, marjauutteita ja rikasteita. Sen lisäksi, että fenolihdisteet tekevät tuotteista terveydellisesti hyödyllisiä, ne voivat toimia tuotteissa esimerkiksi väriaineina (Arktiset Aromit, 2016). Fenolihdisteet ovat kuitenkin suhteellisen epästabiileja yhdisteitä ja ne voivat hajota eri tekijöiden seurauksena prosessoinnin ja säilytyksen seurauksena.

Tämän kandidaatintyön tavoitteena on selvittää kirjallisuuden pohjalta fenolihdisteiden stabiilisuuteen vaikuttavia tekijöitä niiden prosessoinnin ja säilytyksen aikana. Työssä keskitytään suomalaisten marjojen yleisimpiin fenolihdisteisiin ja niiden stabiilisuuteen. Työ kokoaa tapoja, joilla fenolihdisteiden hajoamista voidaan minimoida ja stabiilisuutta parantaa prosessoinnin ja säilytyksen aikana. Näiden tietojen perusteella marjojen prosessointi ja säilytys voidaan toteuttaa eri teollisuuden aloilla niin, että marjojen fenolihdisteet säilyvät mahdollisimman hyvin.

Työn alussa käsitellään yleisesti fenolihdisteitä ja niiden jaottelua. Työssä keskitytään marjojen määrällisesti tärkeimpiin fenolihdisteisiin. Lisäksi työssä keskustellaan fenolihdisteisiin liitetyistä terveysvaikutuksista sekä näiden yhdisteiden pitoisuuksista suomalaisissa marjoissa. Fenolihdisteiden erotusta marjoista esitellään myös lyhyesti. Fenolihdisteiden stabiilisuutta käsitellään eri tekijöiden näkökulmasta prosessoinnin ja säilytyksen aikana. Yhteenvedossa kootaan yhteen tapoja, joilla fenolihdisteiden säilymistä voitaisiin parantaa.

## 2 Materiaalit ja menetelmät

Tässä kandidaatintyössä materiaaleina on käytetty eri tietokannoista löytyviä tieteellisiä artikkeleita sekä aiheeseen liittyvää kirjallisuutta ja muita julkaisuja. Marjojen fenoliyhdisteitä on tutkittu erityisesti niiden terveysvaikutusten ja erotuksen kannalta (Törrönen, 2006; Myllymäki *et al.*, 2007).

Tutkimustietoa fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen liittyen löytyy erityisesti antosyaanien osalta. Tutkimuksissa on selvitetty esimerkiksi rakenteen, pH:n, lämpötilan, kopigmentoinnin ja eri yhdisteiden vaikutusta antosyaanien stabiilisuuteen (Hannula, 2001; Airaksinen, 2006). Muiden fenoliyhdisteiden stabiilisuudesta ei löytynyt yhtä yksityiskohtaista tietoa. Suurin osa tässä työssä käytetyistä tutkimuksista on toteutettu ulkomaisilla marjoilla, mutta niiden fenoliyhdisteet ovat kuitenkin samoja kuin suomalaisten marjojen. Stabiilisuuteen liittyvät tulokset pätevät siis myös suomalaisille marjoille.

Käytetyt tietokannat ja englanninkieliset hakusanat aiheeseen liittyen on esitetty taulukossa I. Tietokantojen lisäksi marja-aiheisia tutkimuksia löytyi koottuna Arktiset Aromit-internetsivustolle (Arktiset Aromit, 2016). Tutkimuksia on tehty myös onkin verran suomenkielellä.

**Taulukko I** Käytetyt tietokannat ja hakusanat.

<b>Tietokannat</b>	<b>Hakusanat</b>
ACS Publications	Phenolic compounds, Phenolic compounds in berries, Polyphenols in plants, Anthocyanin, Stability of phenolic compounds during processing and storage, Effect of heating on phenolic compounds, Extraction of phenolic compounds
SciFinder	
ScienceDirect	
SCOPUS	
SpringerLink eBooks	

### 3 Fenoliyhdisteet

Fenoliyhdisteet ovat kasveissa syntyviä fytokeemikaaleja, jotka toimivat suoja-aineina erilaisia taudinaiheuttajia sekä liiallista UV-säteilyä vastaan. Lisäksi ne antavat kasvikunnan tuotteille niiden tunnusomaisen värin ja maun, sekä toimivat kasvien kasvuhormoneina. Fenoliyhdisteet esiintyvät kasveissa vapaina yhdisteinä tai liittyneinä muihin aineenvaihduntatuotteisiin. Fenolit pystyvät sitomaan metalleja ja ominaisuuksiltaan ne ovat reaktiivisia, happamia ja vesiliukoisia. (Hyvärinen, 2001; Arktiset Aromit, 2016)

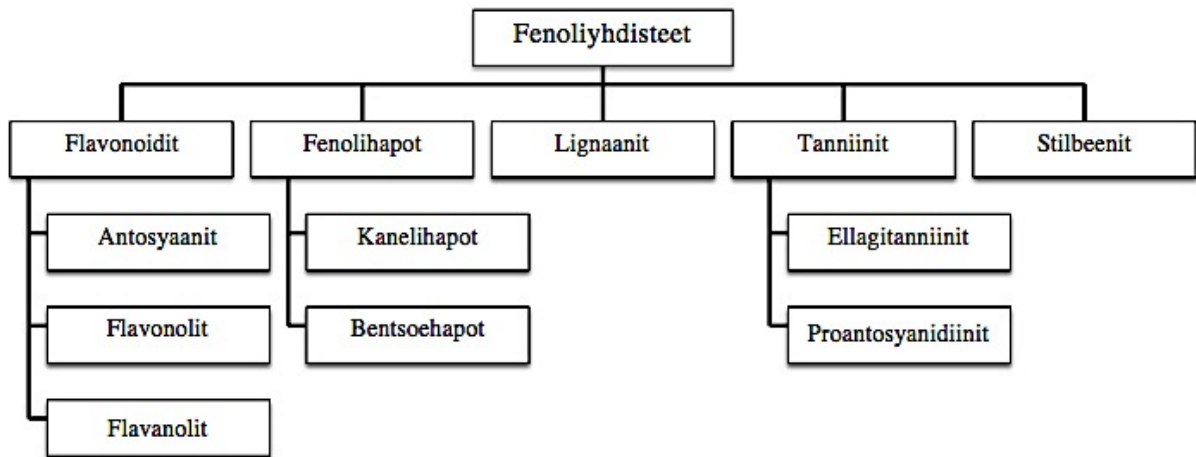
Kasvikunnan tuotteiden fenoliyhdistepitoisuuksia on tutkittu laajasti ja hyviä fenoliyhdisteiden lähteitä ovat esimerkiksi marjat, kasvikset, hedelmät ja viljatuotteet (Mattila & Törrönen, 2006). Näistä elintarvikkeista saadaan erityisesti fenoliyhdisteisiin kuuluvia flavonoideja, fenolihappoja, tanniineja, stilbeenejä ja lignaaneja. Suomessa erilaisia luonnonmarjoja on paljon saatavilla ja ne ovat monipuolisia fenoliyhdistelähteitä. Marjat sisältävät myös paljon muita hyviä ravintoaineita, kuten C- ja E-vitamiineja sekä kivennäisaineita.

Fenoliyhdisteistä ollaan yhä enemmän kiinnostuneita elintarvike-, lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa niiden luonnonmukaisuuden ja terveysvaikutusten takia. Fenoliyhdisteillä on todettu olevan terveydelle hyödyllisiä ominaisuuksia niiden antioksidanttisten sekä muiden biologisten vaikutusten ansiosta. Useat fenoliyhdisteet ovat voimakkaita antioksidantteja, joten ne voivat suojata elimistöä happiradikaalien haitallisilta vaikutuksilta. Lisäksi fenoliyhdisteet vaikuttavat elimistössä sijaitseviin entsyymeihin. Syntyvien entsyymireaktioiden on todettu vaikuttavan positiivisesti tulehduksia, bakteereita, viruksia ja syöpäsoluja vastaan. (Pietta, 2000; Hyvärinen, 2001; Mattila & Törrönen, 2006)

Fenoliset yhdisteet ovat herkän reaktiivisuuden takia hyvin epästabiileja eri ravintoaineissa (Airaksinen, 2006). Niiden stabiilisuus on riippuvainen esimerkiksi ympäristökijöistä, prosessoinnista ja säilytyksestä. Ympäristössä valolla, UV-säteilyllä, pH:lla sekä lämpötilalla on vaikutusta siihen, missä pitoisuuksissa fenoliyhdisteitä esiintyy raaka-aineessa (Hyvärinen, 2001). Prosessoinnissa ja säilytyksessä tulee ottaa huomioon erilaiset käsittelytavat ja muut prosesseissa käytettävät yhdisteet, jotka vaikuttavat fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen.

### 3.1 Jaottelu

Erilaisia fenoliyhdisteitä on tunnistettu luonnosta tuhansia ja ne voidaan jakaa rakenteensa perusteella eri ryhmiin. Kaikille fenoliyhdisteille on kuitenkin yhteistä perusrakenteena toimiva fenoli. Flavonoidit, fenolihapot, lignaanit, tanniinit ja stilbeenit ovat marjojen, kasvien ja elintarvikkeiden tärkeimmät fenoliset yhdisteet. Jaottelu voidaan tehdä esimerkiksi näihin ryhmiin kuvan 1 mukaisesti (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2004).



**Kuva 1.** Fenoliyhdisteiden jaottelu (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2004, muokattu).

Tässä työssä keskitytään tarkastelemaan fenoliyhdisteitä, joita esiintyy suomalaisissa marjoissa eniten. Näitä ovat flavonoidien, fenolihapojen sekä tanniinien alaryhmät, jotka jakaantuvat edelleen eri fenoliyhdisteisiin.

#### 3.1.1 Antosyaanit

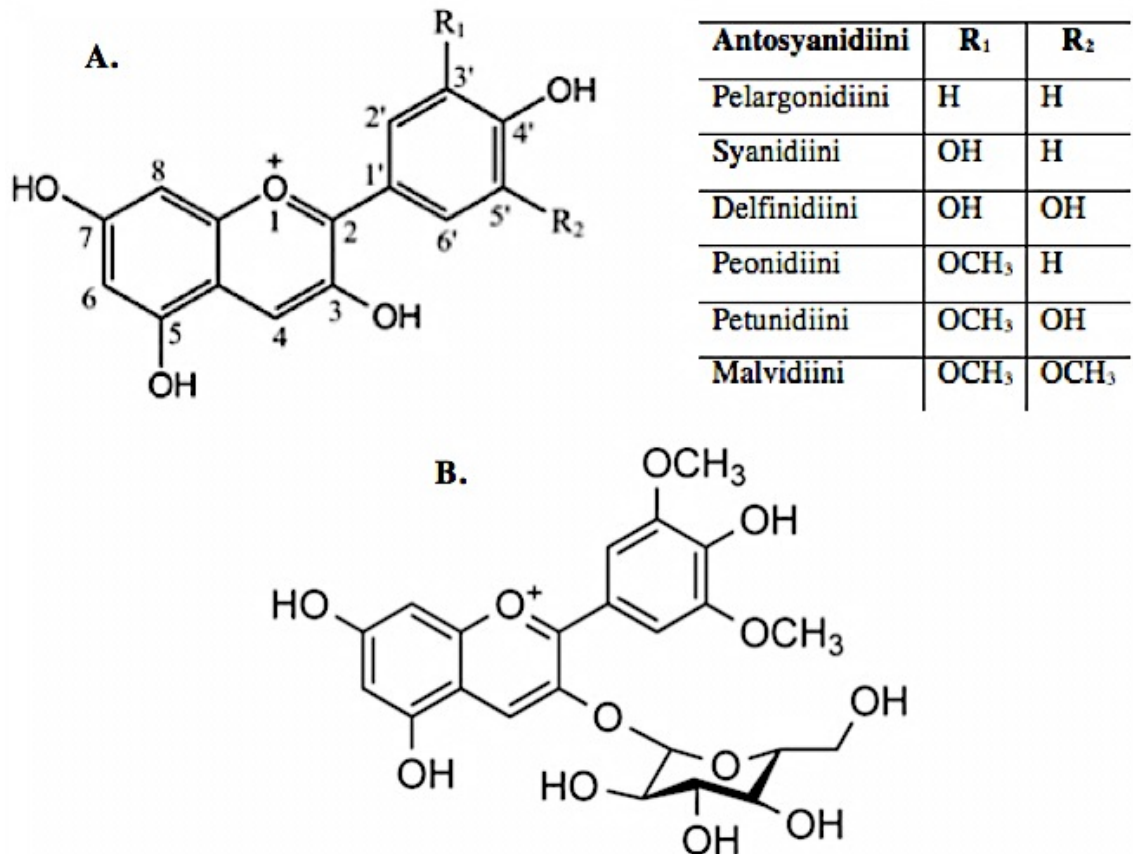
Antosyaanit ovat flavonoidien suurin alaryhmä ja niitä esiintyy kasvien solunesteessä. Ne ovat vesiliukoisia yhdisteitä, joilla on todettu olevan monia terveysvaikutuksia. Antosyaanit antavat kasveille, marjoille ja vihanneksille niiden punaisen, sinisen ja violetin värin. Mustikan voimakas sininen väri johtuu korkeasta antosyaanipitoisuudesta, sillä tummansinisissä marjoissa antosyaaneja esiintyy eniten. Keltaisissa ja värittömissä marjoissa antosyaanipitoisuudet ovat matalia (Arktiset Aromit, 2016). Värin voimakkuuteen vaikuttavat ympäröivän liuoksen pH sekä antosyaaneja kelatoivat metallit (Hannula, 2001). Elintarvike- ja



kosmetiikkateollisuus pystyvät hyödyntämään antosyaaneja luonnollisina väriaineina. Elintarvikkeissa antosyaanit esitetään E-koodilla E 163.

Erilaisia antosyaaneja on tunnistettu noin 500. Niiden runsas määrä johtuu flavylium-ionin (kuva 2) perusrunkoon kiinnittyneiden sivuryhmien moninaisuudesta (Schwartz *et al.*, 2008). Antosyaanit esiintyvät usein antosyanidiiniglykosideina eli antosyaani muodostuu antosyanidiini- ja sokeriosasta. Antosyanidiinit eroavat toisistaan funktionaalisten ryhmien suhteen, mitkä ovat kiinnittyneet flavylium-ionin aromaattisen renkaan R<sub>1</sub> ja R<sub>2</sub> paikoille (kuva 2). Tunnetuimmat antosyanidiiniryhmät ovat syanidiinit, pelargonidiinit, delfinidiinit, peonidiinit, petunidiinit ja malvidiinit (Schwartz *et al.*, 2008).

Sokeriryhmiä voi antosyaaneissa olla yksi tai useampi. Yleisimmät sokeriosat elintarvikkeissa hyödynnettävissä antosyaaneissa ovat glukoosi ja galaktoosi. Muita antosyaanien sokerimolekyylejä ovat arabinoosi, ksyloosi, ramnoosi ja rutinoosi (Schwartz *et al.*, 2008). Malvidiini-3-glykosidin rakenne on esitetty kuvassa 2. Siinä malvidiinin perusrakenteeseen on liittynyt glukoosimolekyyli.



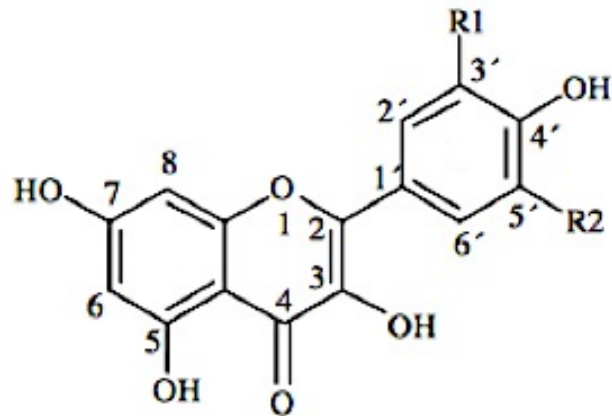
**Kuva 2.** Antosyaanin perusrakenne (A) sekä tunnetuimpien antosyanidiinien funktionaaliset ryhmät taulukoituna. Antosyaanit esiintyvät usein antosyanidiini glykosideina. Esimerkkinä Malvidiini-3-glykosidin rakenne (B) (Schwartz *et al.*, 2008, muokattu).

### 3.1.2 Flavonolit

Tunnetuimpia flavonoleja ovat kversetiini, myrisetiini ja kemferoli. Ne ovat väreiltään haalean keltaisia ja huonosti imeytyviä yhdisteitä (Hyvärinen, 2001). Flavonoleja esiintyy etenkin kasvien kukissa ja lehdistä sekä marjoissa, hedelmissä ja kasviksissa. Flavonolit voivat antosyaanien tapaan esiintyä mono-, di- ja triglykosideina. Yleisin sokeriosa elintarvikkeissa esiintyvillä flavonoliyhdisteillä on glukoosi (Häkkinen, 2000).

Flavonolien perusrakenteen muodostaa 3-hydroksiflavonoidi (kuva 3). Flavonolirakenteen perusrakenne C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> on sama kuin antosyaaneilla. Kversetiini, myrisetiini ja kemferoli

eroavat toisistaan funktionaalisten ryhmiensä ( $R_1$ ,  $R_2$ ) suhteen, mitkä muodostuvat joko H- tai OH-ryhmistä (kuva 3).



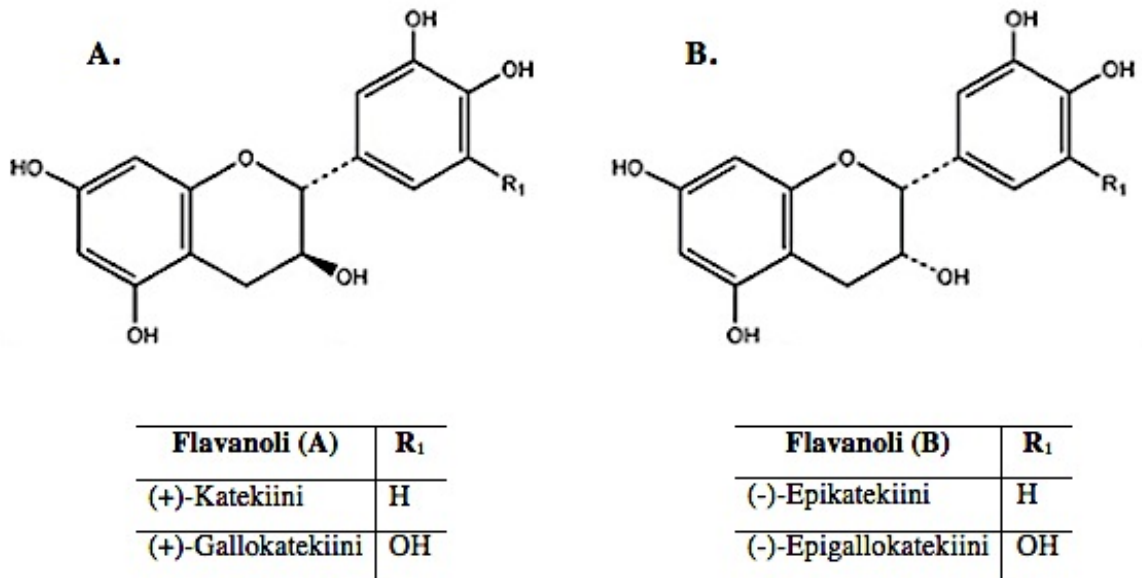
Flavonoli	$R_1$	$R_2$
Kversetiini	OH	H
Myrisetiini	OH	OH
Kemferoli	H	H

**Kuva 3.** Flavonolin perusrakenne sekä tunnetuimpien flavonolien funktionaaliset ryhmät taulukoituna (Linus Paulig Institute, 2016, muokattu).

### 3.1.3 Flavanolit

Flavanolit (flavan-3-olit), eli katekiinit, esiintyvät yleensä aglykoneina tai esteröityneinä gallihapon kanssa. Flavanolit ovat värittömiä ja vesiliukoisia yhdisteitä, jotka ovat herkkiä hapettumiselle (Hyvärinen, 2001; Riihinen, 2005). Flavanolit vaikuttavat elintarvikkeiden makuun, ja niistä johtuu esimerkiksi pihlajanmarjan kitkerä maku (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2004).

Flavanolien alaryhmiin kuuluvat esimerkiksi (+)-katekiini, (-)-epikatekiini, (+)-gallokatekiini ja (-)-epigallokatekiini (Linus Paulig Institute, 2016). Katekiini ja gallokatekiini muodostuvat A-rakenteesta (kuva 4) ja epikatekiini ja epigallokatekiini puolestaan B-rakenteesta (kuva 4). A- ja B-rakenne eroavat toisistaan keskimmäiseen hiilirenkaaseen liittyneen OH-ryhmän sidoksen suhteen. Kun tämä B-rakenteen OH-ryhmä esteröityy gallihapon kanssa, muodostuu (-)-epikatekiinigallaattia tai (-)-epigallokatekiinigallaattia (Linus Paulig Institute, 2016).  $R_1$  paikalle liittyneet funktionaaliset ryhmät ovat eri flavanoleissa H- tai OH-ryhmiä (kuva 4).



**Kuva 4.** Flavanolien perusrakenteet sekä tunnetumpien flavanolien funktionaaliset ryhmät taulukoituna (Linus Paulig Institute, 2016, muokattu).

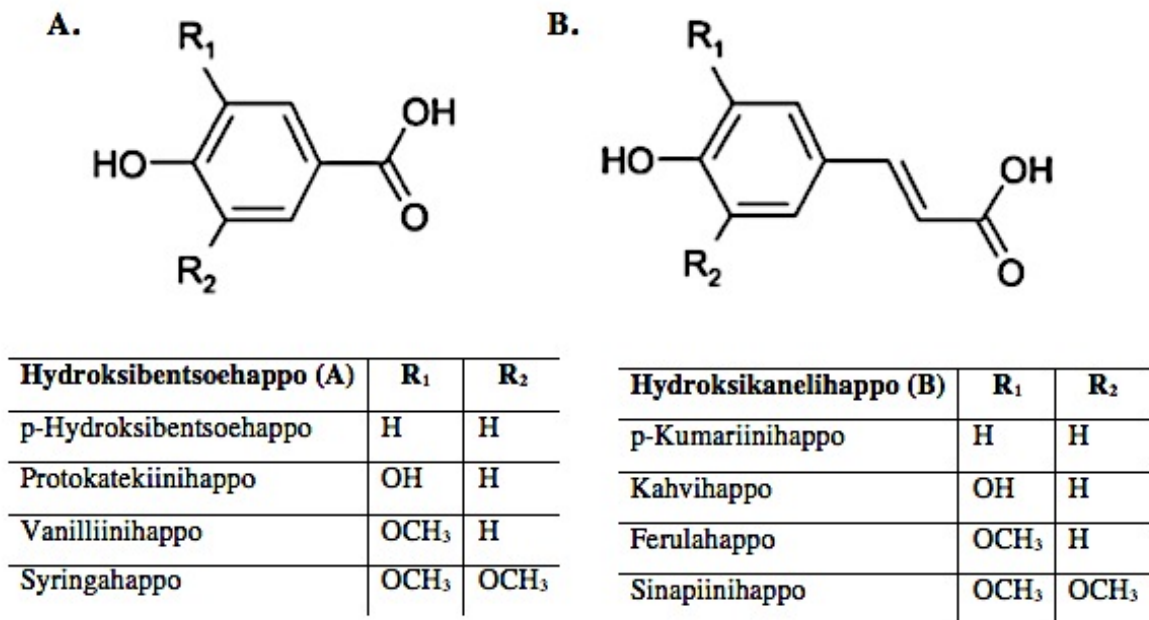
### 3.1.4 Fenolihapot

Fenolihapot voidaan jakaa hydroksikaneli- ja hydroksibentsoehappoihin. Fenolihapot esiintyvät kasveissa harvoin sellaisenaan, sillä ne ovat usein konjugoituneina muihin yhdisteisiin (Riihinen, 2005). Marjoissa fenoliset hapot toimivat luonnollisina säilöntäaineina ja ne estävät myös erilaisten taudinaiheuttajien leviämisen (Arktiset Aromit, 2016).

Tunnettuja hydroksibentsoehappoja ovat p-hydroksibentsoe-, protokatekiini-, vanilliini- ja syringahappo. Nämä hapot esiintyvät usein glykosideina esimerkiksi glukoosin kanssa. Hydroksikanelihapoista tunnettuja puolestaan ovat p-kumariini-, kahvi-, ferula-, ja sinapiinihappo. Hydroksikanelihapot ovat usein esteröityneet kniinihapon tai glukoosin kanssa. (Hyvärinen, 2001; Macheix *et al.*, 1990)

Hydroksibentsoehapon ja hydroksikanelihapon perusrakenteet sekä tunnettujen fenolihappojen funktionaaliset ryhmät R<sub>1</sub> ja R<sub>2</sub> on esitetty kuvassa 5. Molemmassa rakenteissa esiintyy aromaattinen hiilirengas sekä hydroksyyli-ryhmä (-COOH). Hydroksikanelihapon aromaattisesta renkaasta lähtevä hiiliketju on kuitenkin pidempi kuin hydroksibentsoehapolla.

Eri hydroksibentsoe- ja hydroksikanelihapot eroavat toisistaan funktionaalisten ryhmiensä suhteen, mitkä ovat H-, OH- tai OCH<sub>3</sub>-ryhmiä.

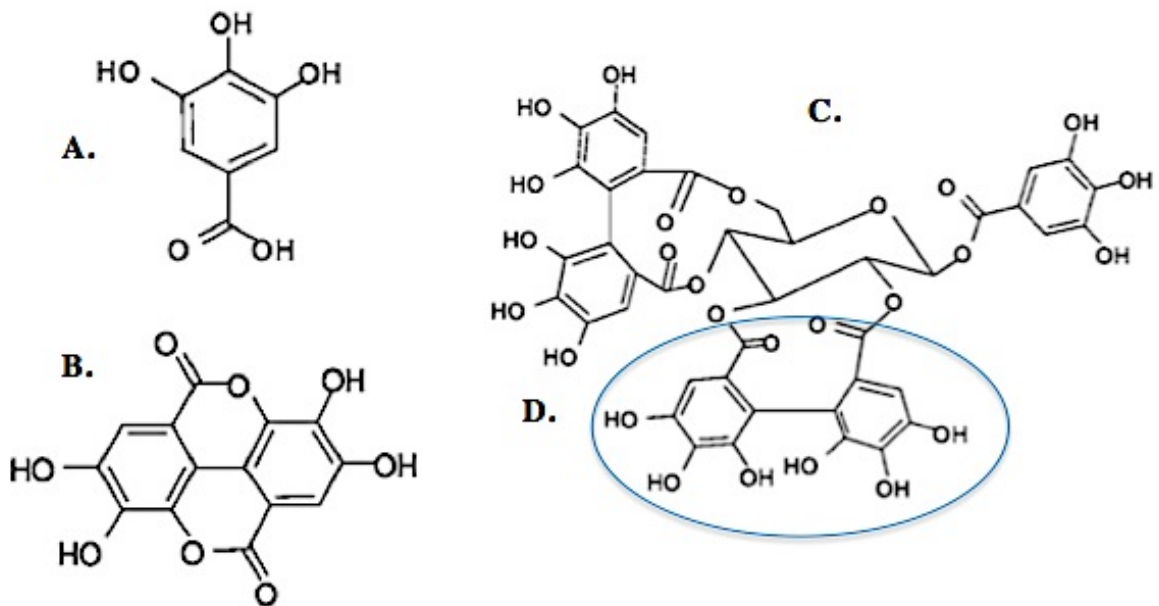


**Kuva 5.** Hydroksibentsoehapon (A) ja hydroksikanelihapon (B) perusrakenteet sekä tunnetuimpien hydroksibentsoe- ja hydroksikanelihappojen funktionaaliset ryhmät taulukoituna (Macheix *et al.*, 1990, muokattu).

### 3.1.5 Ellagitanniinit

Kasvitanniinit jaetaan hydrolysoituviin ja kondensoituneisiin tanniineihin, joista ellagitanniinit kuuluvat ensimmäiseen (Riihinen, 2005). Tähän ryhmään kuuluvat myös gallotanniinit. Ellagitanniinit toimivat antioksidanteina ja niiden on todettu vaikuttavan positiivisesti ihmisten terveyteen (Landete, 2011).

Ellagitanniinit muodostuvat yhdestä tai useammasta heksahydroksidifenyyliryhmästä (HHDP), gallihaposta sekä polyolista, joka on usein glukoosi. Hydrolyysireaktiossa heksahydroksidifenyylireagoi ellagihapoksi (Häkkinen *et al.*, 1999; Landete, 2011). Gallihapon, ellagihapon, sekä ellagitanniinin rakenteet on esitetty kuvassa 6. Ellagitanniinit ovat moolimassaltaan huomattavasti suurempia ja rakenteeltaan monimutkaisempia kuin muut fenoliset yhdisteet. Suuren polymeroitumisasteen ellagitanniineja voidaan pitää huonosti liukenevina yhdisteinä (Riihinen, 2005).

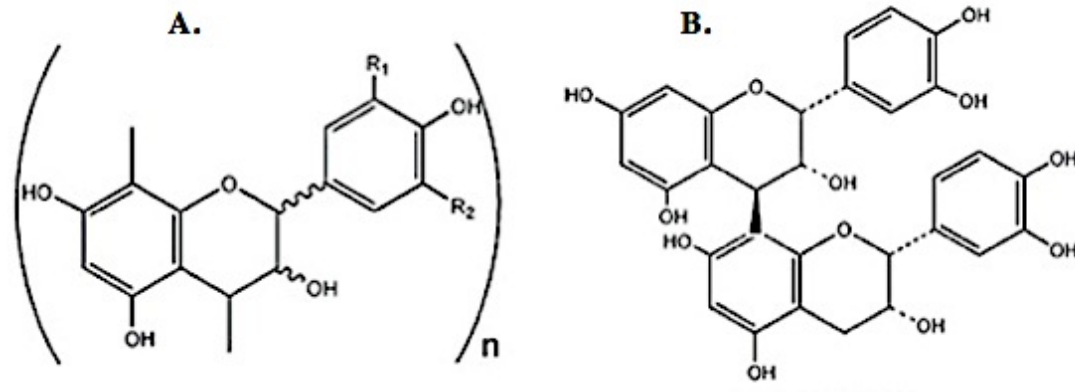


**Kuva 6.** Gallihapon (A), ellagihapon (B) ja ellagitanniinin (galloyyli-bis-HHDP-glukoosi) (C) rakenteet. Ellagitanniinin rakenteesta on ympyröity heksahydroksidifenyyliryhmä (D) (Riihinen, 2005, muokattu).

### 3.1.6 Proantosyanidiinit

Proantosyanidiinit kuuluvat kondensoituneisiin tanniineihin ja ne ovat kemiallisesti flavanoliinien oligomeerejä. Proantosyanidiinit ovat voimakkaita antioksidantteja ja niillä on todettu olevan myös monia terveysvaikutuksia (Hellström *et al.*, 2009). Proantosyanidiinit voivat ellagitanniinien tapaan polymeroitua suuremmiksi molekyyliyhdisteiksi. Yleisimpiä proantosyanidiineja ovat prosyanidiini ja prodelfinidiini (Hyvärinen, 2001).

Proantosyanidiinin ja dimeerisen prosyanidiinin rakenteet sekä näiden funktionaaliset ryhmät ( $R_1$ ,  $R_2$ ) on esitetty kuvassa 7. Prosyanidiini muodostuu katekiinista, epikatekiinista sekä näiden yhdisteiden gallushappojen estereistä. Prodelfinidiini muodostuu puolestaan gallokokatekiinista, epigallokokatekiinista sekä näiden johdannaisista (Hyvärinen, 2001). Dimeerisessä prosyanidiinissa prosyanidiinin monomeerirakenne toistuu kaksi kertaa ( $n=2$ ).



Proantosyanidiini	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Prosyaniidiini	H	OH
Prodelfinidiini	OH	OH

**Kuva 7.** Proantosyanidiinin (A) ja dimeerisen prosyaniidiinin (B) rakenteet sekä tunnetuimpien proantosyanidiinien funktionaaliset ryhmät taulukoituna (Linus Paulig Institute, 2016, muokattu).

### 3.2 Terveysvaikutukset

Marjojen terveysvaikutukset perustuvat marjojen sisältämiin yhdisteisiin ja ravintoaineisiin. Marjojen terveysvaikutuksia on tutkittu in vitro sekä in vivo-tutkimuksilla. In vitro-tutkimuksissa koe suoritetaan elimistön ulkopuolella kuten koeputkessa tai soluviljelymaljassa. Nämä kokeet ovat nopeampia, helpompia ja halvempia kuin eläimillä ja ihmisillä teetetyt kokeet ja siksi myös suositumpia (Törrönen, 2006). In vitro-kokeiden tuloksia ei voida kuitenkaan suoraan verrata mahdollisiin vaikutuksiin ihmisen elimistössä. In vivo-tutkimuksissa tutkimus tehdään elävässä elimistössä kuten koe-eläimessä tai -ihmisessä, jolloin terveysvaikutukset on helpompi todentaa. Riittävä terveysvaikutusten näyttö saadaan kuitenkin vasta ihmisillä teetetyillä kliinisillä tutkimuksilla (Törrönen, 2006). Tällä hetkellä tieteellinen näyttö marjojen terveysvaikutuksista on ristiriitaista, sillä kaikkia terveysvaikutuksia ei ole voitu todentaa tarpeeksi hyvin tai luotettavasti ihmisillä.

Marjojen fenoliyhdisteiden terveysvaikutukset perustuvat niiden antioksidanttisiin sekä muihin biologisiin ominaisuuksiin. Elimistössä antioksidantit estävät vapaiden radikaalien kuten peroksidi- ja hydroksyyli-radikaalien aiheuttamaa hapettumista. Vapaat radikaalit voivat

elimistössä vaurioittaa DNA:ta, solukalvojen rakenteita sekä lipoproteiineja. Näillä vaikutuksilla uskotaan olevan yhteys erilisiin kroonisiin sairauksiin kuten sydän- ja verisuonitauteihin sekä syöpään. (Pietta, 2000; Törrönen, 2006; Tuomela *et al.*, 2013)

Tutkimustietoa marjojen ja fenoliyhdisteiden terveysvaikutuksista on esitetty kattavasti Törrösen tekemässä kirjallisuustutkimuksessa (Törrönen, 2006). Terveysvaikutusten tutkimukset käsittelevät yleensä fenoliyhdisteiden osalta niiden antioksidatiivisuutta, antidiabeettisuutta, antimikrobisuutta, anti-inflammatorisuutta, antiadheesiota sekä antitumoraalisuutta. Taulukossa II on esitetty eri marjojen sisältämien fenoliyhdisteiden terveysvaikutuksia. Marjojen antimikrobiset ja antiadheesiset fenoliyhdisteet estävät mikrobien sekä bakteerien leviämisen ja tarttumisen (Tuomela *et al.*, 2013). Anti-inflammatoriset fenoliyhdisteet puolestaan ehkäisevät tulehduksia (Tuomela *et al.*, 2013). Joidenkin fenoliyhdisteiden on todettu olevan antitumoraalisia eli ne toimivat syöpäsoluja vastaan. Antidiabeettiset fenoliyhdisteet puolestaan alentavat glukoosin määrää veressä (Tuomela *et al.*, 2013).



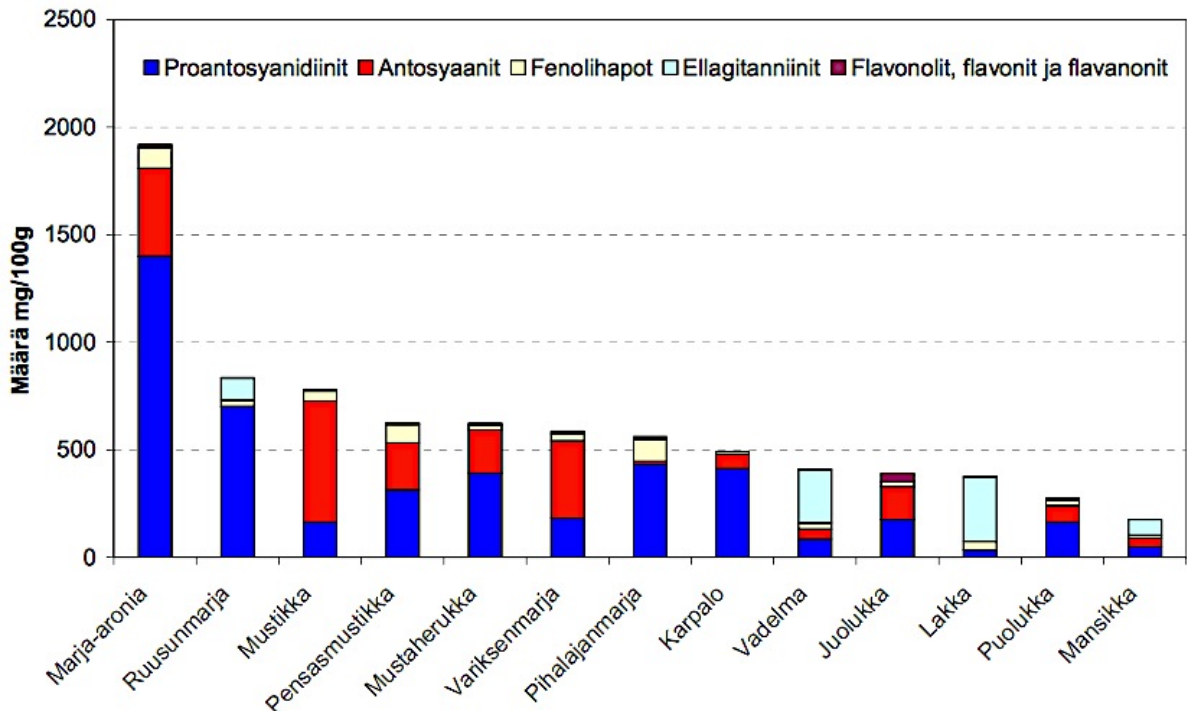
**Taulukko II** Marjakohtaiset fenoliyhdisteet ja niiden terveysvaikutukset (Tuomela *et al.*, 2013, muokattu)

Marja	Fenoliyhdiste	Terveysvaikutus
Mustikka	Antosyaani	Antioksidantti
		Anti-inflammatorinen
		Mahalaukkaa suojaava
		Antidiabeettinen
	Ellagitanniini	Antidiabeettinen
	Kversetiini	Antidiabeettinen
	Proantosyanidiini	Antiadheesio
Karpalo	Antosyaani	Antioksidantti
		Anti-inflammatorinen
	Proantosyanidiini	Antiadheesio
	Hydroksikanelihappo	Antioksidantti
Puolukka	Antosyaani	Antioksidantti
	Proantosyanidiini	Antiadheesio
Aronia	Antosyaani	Antioksidantti
		Anti-inflammatorinen
		Verenpainetta alentava
		Antimikrobinen
		Antidiabeettinen
	Proantosyanidiini	Anti-inflammatorinen
		Verenpainetta alentava
		Antiadheesio
Mustaherukka	Antosyaani	Antioksidantti
		Antidiabeettinen
		Antiviraalinen
		Anti-inflammatorinen
	Ellagitanniini	Antidiabeettinen
Variksenmarja	Proantosyanidiini	Antiadheesio
Seljanmarja	Antosyaani	Antiadheesio
	Proantosyanidiini	Antiadheesio
Lakka	Proantosyanidiini	Antiadheesio
	Ellagitanniini	Antimikrobinen
Tyrni	Flavonoidit	Antioksidantti
		Vähentää veritulpan riskiä
	Proantosyanidiini	Antioksidantti
Juolukka	Antosyaani	Ehkäisee sydän ja verisuonitauteja sekä syöpää
	Flavonoli	Ehkäisee sydän ja verisuonitauteja sekä syöpää

Tällä hetkellä fenoliyhdisteisiin liitettyjä varmoja terveysvaikutuksia ovat esimerkiksi veren antioksidanttiaktiivisuuden lisääntyminen, LDL-kolesterolin hapettumisen vähentyminen, verenpaineen aleneminen sekä kasvainten, bakteerien, virusten ja tulehdusten väheneminen (Tuomela *et al.*, 2013). Eri fenoliryhmät imeytyvät elimistössä kuitenkin eri tavoin, jolloin terveysvaikutukset saattavat vaihdella riippuen fenoliyhdisteestä (Mattila & Törrönen, 2006).

### **3.3 Pitoisuudet suomalaisissa marjoissa**

Suomalaiset marjat ovat erinomaisia fenoliyhdisteiden lähteitä, sillä niiden fenoliyhdistepitoisuudet ovat suurempia kuin monien kasvien, hedelmien ja muiden elintarvikkeiden. Pitoisuudet voivat kuitenkin vaihdella huomattavasti eri marjalajien välillä. Kuvassa 8 on esitetty proantosyanidiinien, antosyaanien, fenolihappojen, ellagitanniinien sekä flavonolien, flavonien ja flavanonien keskimääräisten pitoisuuksien (mg/100g) jakaantuminen 14:ssä eri suomalaisessa marjassa. Lajikkeen lisäksi yhdisteiden pitoisuuksiin vaikuttavat myös monet muut tekijät, kuten kasvupaikan maantieteellinen sijainti, sääolosuhteet ja kypsyyssaste (Törrönen, 2006).



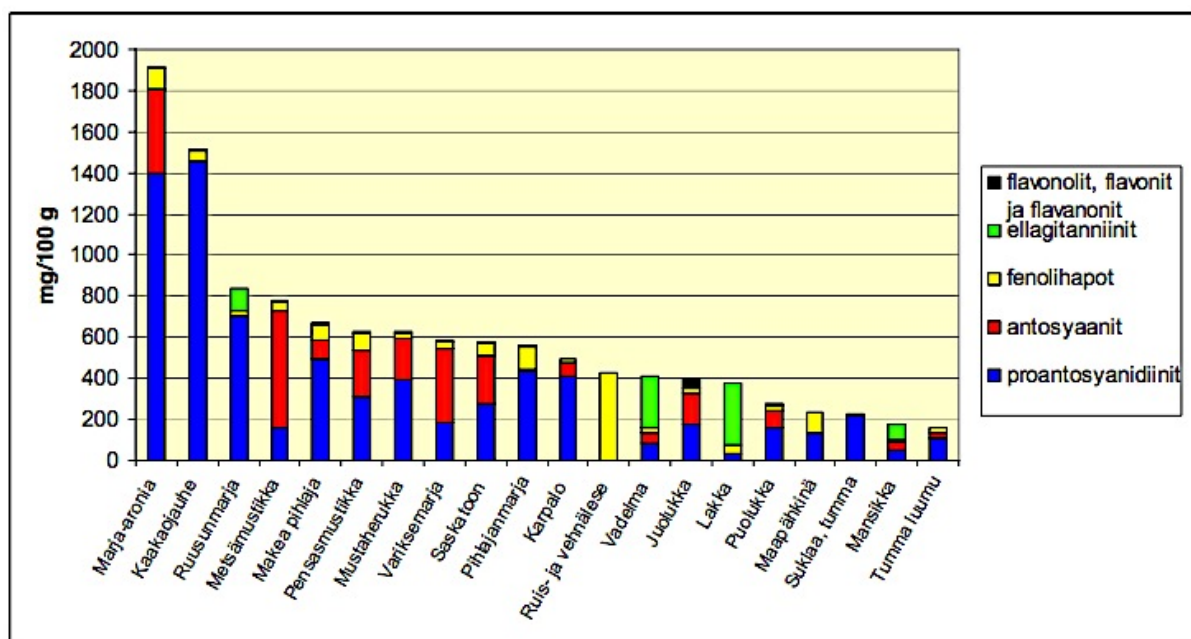
**Kuva 8.** Keskimääräiset fenoliyhdistepitoisuudet (mg/100g) 14:ssä eri suomalaisessa marjassa (Törrönen, 2006).

Eniten fenoliyhdisteitä esiintyi marja-aroniassa, ruusunmarjassa ja mustikassa. Proantosyanidiinit ja antosyaanit esiintyvät suurina pitoisuuksina (300-1400 mg/100g) useassa marjassa, kun taas näihin verrattuna flavonolien, flavonien ja flavanonien pitoisuudet jäävät pieniksi. Määrällisesti proantosyanidiinit ja antosyaanit ovat siis tärkeimpiä fenoliyhdisteitä. Paras proantosyanidiinilähde tulosten mukaan oli marja-aronia ja paras antosyaanilähde puolestaan mustikka.

Hertog ja Katan (1998) totesivat elintarvikkeiden flavonolipitoisuuden olevan korkea, jos se ylittää 50 mg/kg. Häkkinen *et al.* (1999) tutkivat tarkemmin flavonoleihin kuuluvaa kversetiinia, myrisetiinia ja kemferolia sekä näiden pitoisuuksia 25:ssä elintarvikkeeksi kelpaavassa marjassa. Tuloksissa todettiin, että suurimmat flavonolipitoisuudet esiintyivät juolukassa, karpalossa, puolukassa, variksenmarjassa sekä mustaherukassa (60–157mg/kg). Lakassa ja (punaisessa) vadelmassa pitoisuudet olivat puolestaan pienimmät (<10mg/kg). Mansikassa flavonolipitoisuus jäi myös alhaiseksi (15 mg/kg). Tämä näkyy myös kuvassa 8.

Fenolihapoja esiintyy kaikissa marjoissa, kun taas ellagitanniineja on huomattavina määriä ainoastaan ruusunmarjassa, vadelmassa, lakassa ja mansikassa. Fenolihapoja esiintyy erityisesti pihlajanmarjassa, mustikassa ja pensasmustikassa. Marjat ja pähkinät ovat tärkeimpiä ellagitanniinien lähteitä, sillä muissa elintarvikkeissa niitä ei juurikaan esiinny (Törrönen & Riihinen, 2004).

Finelin koostumustietopankkiin (Fineli, 2016) on kerätty proantosyanidiinien, antosyaanien, fenolihapojen, ellagitanniinien sekä flavonolien, flavonien ja flavanonien pitoisuudet tärkeimmissä marjoissa, hedelmissä, kasviksissa, juomissa ja viljatuotteissa. Kuvassa 9 on esitetty 20 parasta fenoliyhdistelähdettä (Mattila & Törrönen, 2006). 20 parhaan fenolilähteen joukossa on 15 marjaa ja 5 muuta elintarviketta. Eniten fenoliyhdisteitä on tutkimuksen mukaan marja-aroniassa (2% tuorepainosta). Marja-aroniaa voidaan siis pitää parhaimpana fenoliyhdistelähteenä, kun vertailussa otetaan marjojen lisäksi huomioon myös muut yleisesti käytetyt elintarvikkeet. Kaakaojauhe on toiseksi paras fenoliyhdistelähde ja siinä on enemmän proantosyanidiineja kuin marja-aroniassa. Mikään marjoista ei yltänyt ruis- ja vehnäleseiden fenoliyhdistepitoisuuksiin.



**Kuva 9.** 20 parasta fenoliyhdistelähdettä (Mattila & Törrönen, 2006).

Fenolihdisteiden pitoisuudet eroavat huomattavasti kun vertaillaan keskenään esimerkiksi mustikkaa ja siitä tehtyä uutetta. Tähän on syynä prosessoinnin ja säilytyksen vaikutus fenolihdisteisiin ja niiden stabiilisuuteen. Erityisesti lämpökäsittely vaikuttaa fenolihdistepitoisuuden alenemiseen, kun marjoja aletaan jatkojalostamaan (Srivastava *et al.*, 2007). Jotta fenolihdistepitoisuudet saadaan säilytettyä korkeina myös marjaraaka-aineen prosessoinnin ja säilytyksen jälkeen, on tärkeä tietää fenolihdisteiden erotustekniikoista sekä fenolihdisteiden stabiilisuuteen vaikuttavista tekijöistä.

## 4 Fenoliyhdisteiden talteenotto

Fenoliyhdisteiden teollisessa tuotannossa fenoliyhdiste uutetaan raaka-aineesta, jonka jälkeen uutettu liuos yleensä puhdistetaan ja konsentroidaan. Syntyviä rikasteita voidaan hyödyntää elintarvike-, kosmetiikka- ja lääketeollisuudessa. Elintarvikeprosesseissa tulee huomioida elintarvikekäyttöön sopiva orgaaninen uuttoliuotin. Elintarvikkeiden, lääkeaineiden ja kosmeettisten tuotteiden lisäaineina fenoliyhdisterikasteet eivät saa sisältää terveyden kannalta haitallisia komponentteja. Erotus ja puhdistus on siis aiheellista tehdä haitallisten komponenttien poistamiseksi sekä fenoliyhdisteiden stabiilisuuden parantamiseksi (Hannula, 2001).

### 4.1 Uuttaminen marjoista

Fenoliyhdisteiden uutto voidaan tehdä tuoreista marjoista, mutta marjojen pakastekuivaus on myös yleistä ennen uuttamista. Pakastekuivaus poistaa nesteen marjoista, jolloin marjat säilyvät pidempään ja eri ravintoaineet ja yhdisteet säilyvät niissä paremmin (Howard *et al.*, 2012). Marjojen pakastekuivaus mahdollistaa sen, että prosessointia ei tarvitse tehdä heti marjojen keräyksen jälkeen. Kokonaiset marjat tulee murskata ennen uuttoa pienemmiksi, jotta uuttoliotin pääsee paremmin kosketuksiin näytteen kanssa. Fenoliyhdisteiden uutto on taloudellisesti kannattavinta tehdä elintarviketeollisuudesta syntyvistä sivuvirroista, sillä marjojen kuori- ja puristusjätteet sisältävät paljon fenoliyhdisteitä, jotka voidaan vielä hyödyntää (Hannula, 2001).

Uuttoliottimena käytetään elintarvikeprosesseissa etanolia, sillä se on ainoa liuotin, joka sopii tähän käyttötarkoitukseen. Muissa prosesseissa uuttoliuottimina voidaan käyttää myös muita orgaanisia liuottimia kuten butanolia tai etyyliasettaattia, happamalle pH-alueelle säädettyä vettä tai veden ja orgaanisen liottimen seosta (Myllymäki *et al.*, 2007).

### 4.2 Erotus ja puhdistus

Marjauutteet sisältävät uuton jälkeen yleensä myös monia muita raaka-aineesta peräisin olevia yhdisteitä. Sokerit, mineraalit ja muut orgaaniset yhdisteet erotetaan yleensä uutteen sekä

fenoliyhdisteiden säilyvyyden parantamiseksi sekä käyttöominaisuuksien vuoksi. Elintarvikkeiden, lääkeaineiden ja kosmeettisten tuotteiden lisäaineina uutteen eivät saa sisältää terveydelle vaarallisia yhdisteitä. Fenoliyhdisteet voidaan erottaa marjauutteesta adsorptiolla (Myllymäki *et al.*, 2007). Toinen mahdollisuus on puhdistaa fenoliyhdisteitä uuttamalla joko neste-neste-uutolla tai kiintoaineuutolla. Näistä menetelmistä adsorptioerotus on selektiivisyytensä vuoksi käytetyin (Myllymäki *et al.*, 2007).

Kähkönen *et al.* (2001) ovat tutkineet uuttomenetelmän vaikutusta marjauutteiden fenoliyhdistekoostumukseen ja antioksidanttiaktiivisuuteen. Tutkimuksessa pakastekuivattuun marja-ainekseen lisättiin liuotinta (asetonia, metanolia, heksaania tai vettä), jonka jälkeen seos homogenisoitiin minuutin ajan. Uutto toistettiin kaksi kertaa, kun liuottimena käytettiin vettä ja muilla liuottimilla kerran. Jokaisen uuton jälkeen liuokset sentrifugoitiin kiintoaineen erottamiseksi ja yhdistettiin. Lopuksi liuotin haihdutettiin. SPE-puhdistuksella (kiinteäfaasiuutolla) uutteen poistettiin sokerit. Saaduissa tuloksissa todettiin, että uuttomenetelmä ja uuttoliuotin sekä uutteen puhdistus vaikuttivat merkittävästi marjauutteiden fenoliyhdistekoostumukseen sekä antioksidanttien aktiivisuuteen. 60 % metanolilla saatiin paras fenoliyhdisteiden saanto ja vedellä puolestaan huonoin. SPE-puhdistuksen todettiin parantavan fenoliyhdisteiden antioksidanttista aktiivisuutta ja lisäävän niiden stabiilisuutta.

#### **4.2.1 Adsorptio**

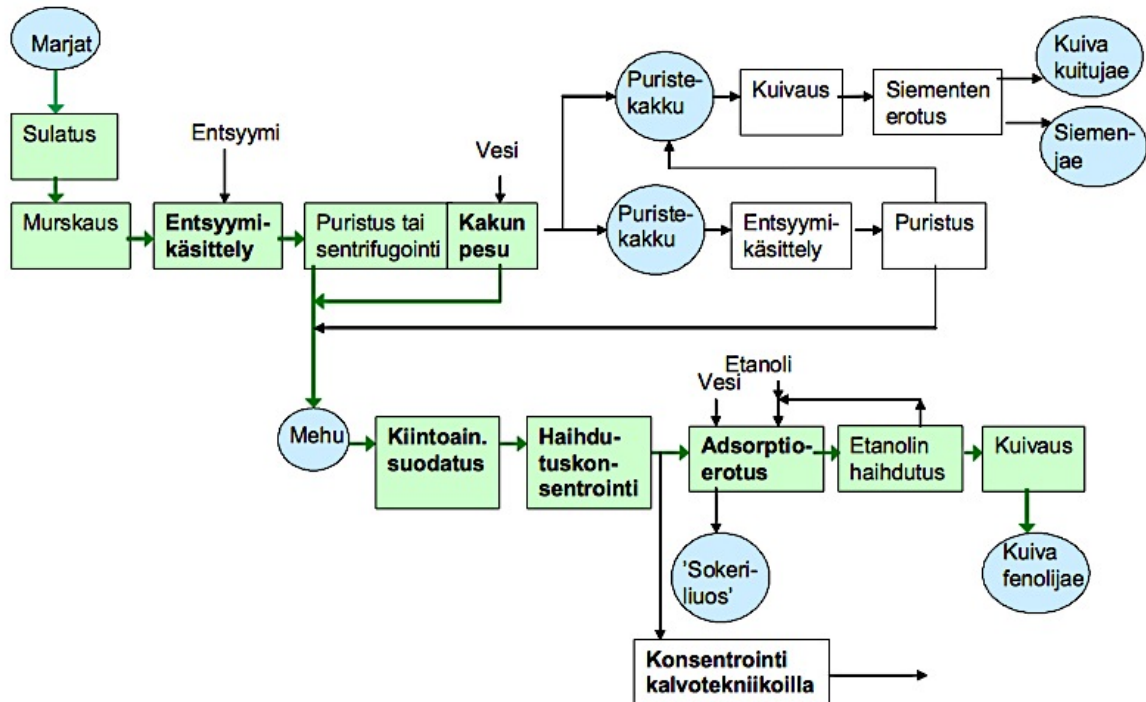
Adsorptiolla pystytään rikastamaan fenoliyhdisteitä 20%:iin tai suurempiin pitoisuuksiin. Rikastusprosessissa fenoliyhdisteet adsorboituvat absorbenttien muodostamaan kiintoaasiin ja epäpuhtaudet eluoituvat kolonnin läpi. Prosessi voidaan suorittaa myös niin päin, että epäpuhtaudet adsorboituvat kiintoaasiin ja fenoliyhdisteet kulkeutuvat kolonnin läpi. Ensin mainittu prosessi on kuitenkin yleisempi tapa teollisuudessa. Absorbenttiin adsorboituneet fenoliyhdisteet tulee eluoida kolonnista sopivalla liuottimella, jolloin näyte saattaa laimentua. Elintarvikkeprosessissa eluenteina käytetään yleensä etanolin vesiliuoksia. Eluutin valinta sekä sen happamuus vaikuttavat tuotteen koostumukseen, jolloin eri fenoliyhdisteet voidaan erottaa omina fraktioina tai eluoida yhdessä. (Myllymäki *et al.*, 2007; Hannula, 2001)

Absorbentteina erotuksessa voidaan käyttää ioninvaihtohartseja (Myllymäki *et al.*, 2007). Usein erotuksessa käytetään myös neutraaleja polymeerihartseja kuten styreenipolymeerejä. Ioninvaihtohartisen funktionaalisista ryhmistä riippuen niihin absorboituu puhdistettavasta liuoksesta negatiivisesti tai positiivisesti varautuneita yhdisteitä. Happamassa liuoksessa esiintyvä antosyaanin flavylium-ioni voidaan fraktioida hyvin esimerkiksi kationinvaihtohartsilla. (Myllymäki *et al.*, 2007; Hannula, 2001)

#### **4.2.2 Teolliset erotusprosessit**

Fenoliyhdisteiden erotusprosesseille ei ole esteitä teollisessa mittakaavassa, sillä erotusmenetelmät ovat yleisesti tunnettuja. Erotusprosessit ovat yleensä myös pääpiirteiltään samanlaisia. Myllymäki *et al.* (2007) ovat tutkineet marjojen fenolisten yhdisteiden eristämisen teknologiaa ja esittäneet selvityksessään mahdolliset fenoli-/antosyaaniuutteiden valmistusprosessit (kuva 10). Prosessissa lähtöraaka-aineena ovat kokonaiset pakastetut marjat ja liuottimina käytetään vettä sekä etanolia. Fenoliyhdisteet voidaan erottaa marjasta saatavasta mehusta sekä mehun valmistuksessa syntyvästä puristekakusta. Erotus puristekakusta on kuitenkin suhteellisen vaikeaa, sillä fenoliyhdisteet kiinnittyvät voimakkaasti marjan kuitufraktioon.





**Kuva 10.** Fenoli-/antosyaaniuutteen valmistusprosessin kuvaus (Myllymäki *et al.*, 2007).

Prosessissa käytettävä entsyymikäsittely hajottaa marjojen sisältämän pektiinin ja parantaa mehusaantoa. Pektini tulee erottaa, sillä se aiheuttaa ongelmia adsorptioerotuksessa ja muissa prosessoinnin vaiheissa. Tietyn entsyymien käyttö ja määrä riippuu prosessoitavasta marjasta, sillä esimerkiksi puolukalla on korkeampi pektiinipitoisuus kuin mustikalla. Entsyymivalmisteet sisältävät lähes aina erilaisia sivuvaikutuksia, jotka voivat vaikuttaa fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen. (Myllymäki *et al.*, 2007)

Entsyymikäsittelyä seuraa puristusvaihe, jonka jälkeen kiintoaineet erotetaan suodattamalla tai sentrifugoinnilla. Kiintoaineen määrä sekä partikkelikoko vaikuttavat prosessissa käytettävien laitteiden valintaan. Ennen mehun adsorptioerotusta suodatettu mehu voidaan konsentroida haluttuun väkevyyteen. (Myllymäki *et al.*, 2007)

## 5 Fenoliyhdisteiden stabiilisuus

Fenoliyhdisteet ovat suhteellisen reaktiivisia ja epästabiileja yhdisteitä. Erityisesti prosessointi- ja säilytysolosuhteet vaikuttavat niiden stabiilisuuteen (Howard *et al.*, 2012). Fenoliyhdisteiden stabiilisuuden parantaminen sekä hajoamisen minimointi näiden toimenpiteiden aikana on siis tärkeää. Prosessointi ja säilytys voivat kuitenkin vaikuttaa eri tavoin eri marjalajikkeisiin ja fenoliyhdisteisiin. Esimerkiksi antosyaanien on todettu prosessoinnin aikana tuhoutuvan herkemmin kuin flavonolien ja ellagitanniinien (Törrönen, 2006). Tämä johtuu luultavimmin rakenteen vaikutuksesta yhdisteen stabiilisuuteen eri olosuhteissa.

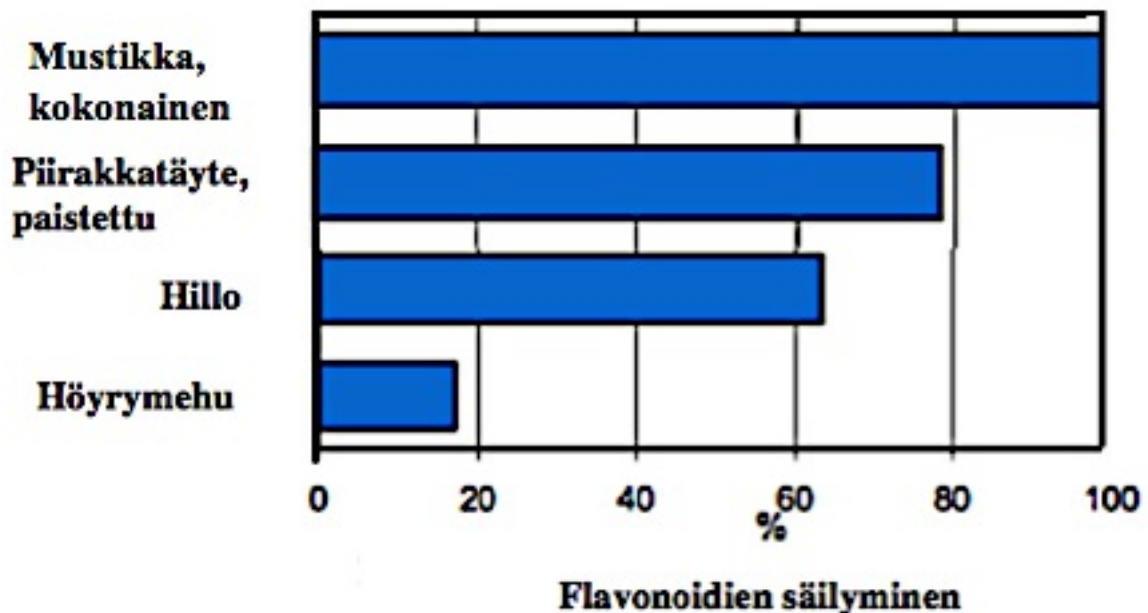
Erityisesti antosyaanien stabiilisuuteen vaikuttavia tekijöitä on tutkittu paljon niiden herkän reaktiivisuuden ja hajoamisen takia (Hannula, 2001; Airaksinen, 2006). Antosyaanien rakenne sekä ulkoiset tekijät kuten pH, lämpötila, happi, valo, entsyymit, C-vitamiini, sokerit, metallit ja kopigmentointi vaikuttavat antosyaanien stabiilisuuteen (Hannula, 2001).

### 5.1 Stabiilisuus prosessoinnin aikana

Marjoista valmistetaan Suomessa perinteisesti hilloja, mehuja, marmeladeja ja alkoholituotteita. Näiden lisäksi marjoista voidaan jalostaa myös marjauutteita ja -rikasteita, kuivattuja marjatuotteita sekä siemenöljyjä. Prosessoinnin aikana eri prosessivaiheet, olosuhteet sekä prosesseissa käytettävät muut yhdisteet vaikuttavat fenolisten yhdisteiden stabiilisuuteen ja säilymiseen. Yleisesti fenoliyhdisteet pysyvät stabiileina kokonaisissa marjoissa paremmin kuin murskatuissa. Murskaus altistaa fenoliyhdisteet helpommin hapelle ja aiheuttaa entsyymireaktioita, jolloin fenoliyhdisteet voivat hajota helpommin (Hyvärinen, 2001). Marjoista jalostetut tuotteet toimivat silti hyvinä fenoliyhdistelähteinä moniin muihin elintarvikkeisiin verrattuna (Törrönen, 2006).

Kuvassa 11 on havainnollistettu prosessoinnin vaikutusta mustikan flavonoideihin (antosyaanien ja flavonolien kokonaismäärä). Mustikasta tehdyssä höyrymehussa flavonoideja on vähiten verrattuna kokonaiseen mustikkaan. Mustikasta paistetussa piirakatäytteessä sekä mustikkahillossa flavonoideja on säilynyt suhteellisen paljon (64–78 %). Marjamehujen

valmistuksessa on todettu tapahtuvan eniten fenolihdisteiden hajoamista, sillä mehujen valmistus koostuu useammasta fenolihdisteitä vähentävästä ja hajottavasta prosessivaiheesta. Näitä ovat esimerkiksi marjojen murskaus, entsyymikäsittely, puristus ja pastörointi (Guiné & Barroca, 2014). Näiden toimenpiteiden aikana hapettimien läsnäolo aiheuttaa etenkin antosyaanien hajoamisen (Howard *et al.*, 2012). Suurin osa fenolihdisteitä jää mehun valmistuksessa myös kuori- ja puristusjätteeseen, jolloin ne eivät päädy lopulliseen tuotteeseen.



**Kuva 11.** Prosessoinnin vaikutus mustikan flavonoideihin (Riihinen, 2005, muokattu).

### 5.1.1 Lämpökäsittely

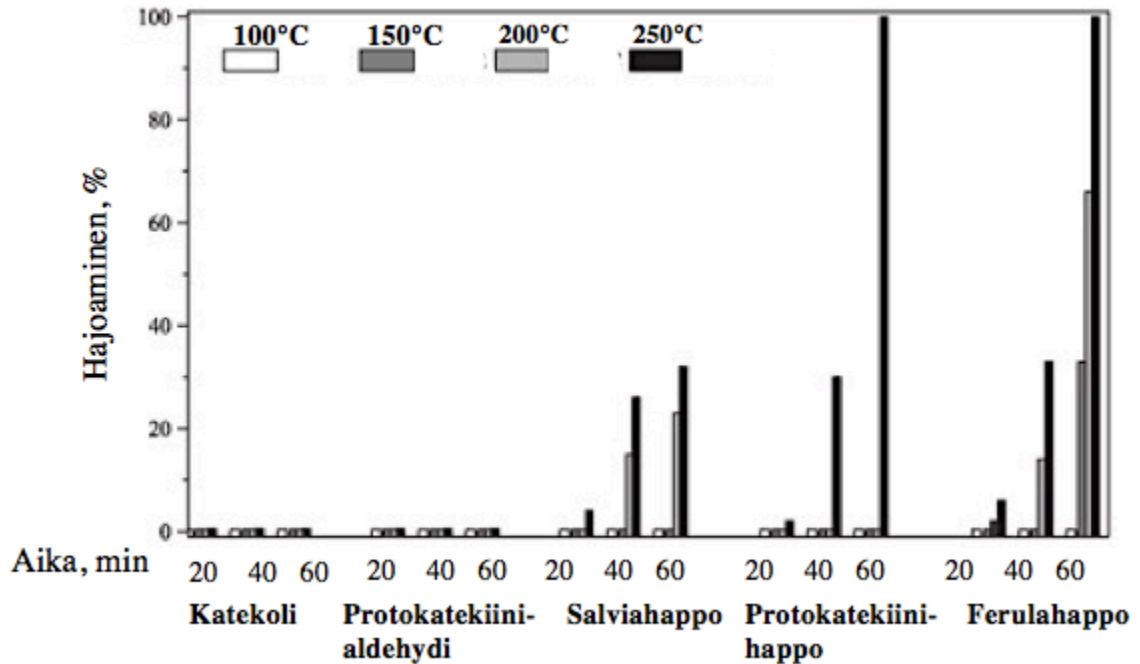
Prosessin lämpötilalla ja kuumennusprosessin kestolla on usein vaikutusta fenolihdisteiden säilyvyyteen. Korkea lämpötila kiihdyttää hajoamisreaktioita, jotka tapahtuisivat hitaammin ympäristön lämpötilassa. Tämän takia pitkäkestoinen lämpökäsittely korkeassa prosessilämpötilassa aiheuttaa fenolihdisteiden nopeamman hajoamisen.

Arancibia-Avila *et al.* (2011) määrittivät eripituisten lämpökäsittelyiden vaikutusta marjauutteiden bioaktiivisiin komponentteihin (polyfenoleihin, flavonoideihin, tanniineihin,

antosyaaneihin ja askorbiinihappoon). Marjoja lämpökäsiteltiin 100 °C lämpötilassa 10 min, 20 min, 40 min ja 60 min ajan. Tutkimuksessa todettiin, että 20 min jälkeen marjojen bioaktiivisten komponenttien pitoisuudet ja antioksidanttiset ominaisuudet säilyivät samoina kuin käsittelemättömien marjojen. Yli 20 min lämpökäsittely puolestaan vähensi uutteen sisältämien yhdisteiden bioaktiivisuutta ja pitoisuuksia (Arancibia-Avila *et al.*, 2011). 20 min lämpökäsittelyn jälkeen marjojen antosyaaneja oli jäljellä noin 97 % ja 40 min jälkeen puolestaan 76 %. 60 min prosessoinnin jälkeen antosyaaneja oli hajonnut yli puolet (53 %). Samanlaisia tuloksia on saatu marjamehujen valmistuksessa, joissa lämpökäsittely 100 °C alle 12 min ei vaikuttanut juurikaan antosyaanien hajoamiseen (Hyvärinen, 2001).

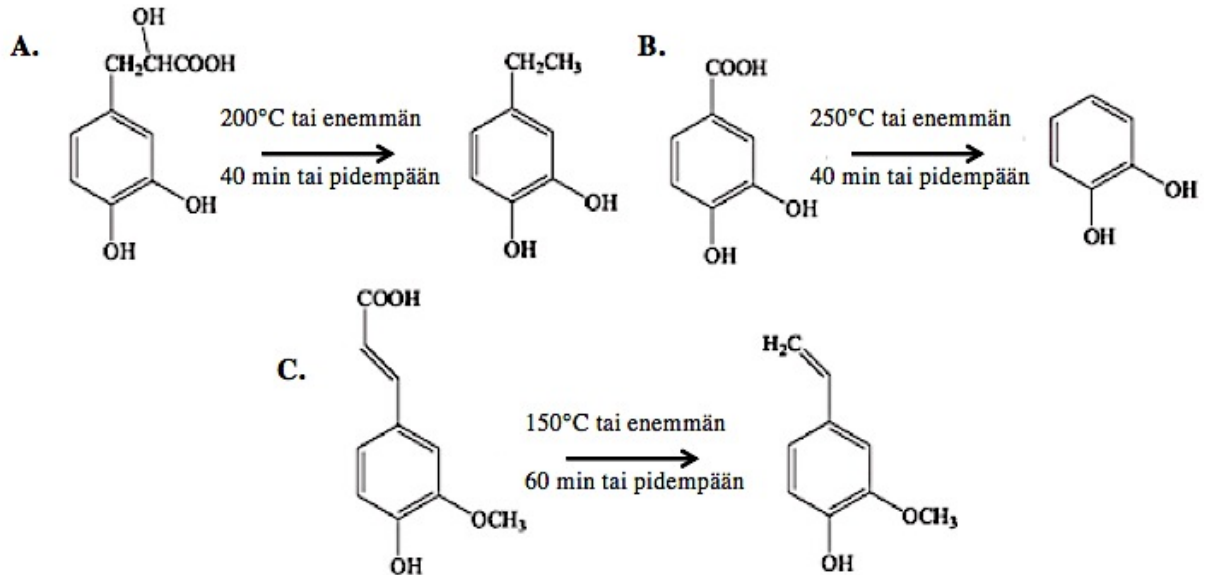
Lämpötila vaikuttaa huomattavasti myös mustikan sisältämien proantosyanidiinien hajoamiseen. Khanal *et al.* (2010) tutkivat näiden yhdisteiden hajoamista 40 °C, 60 °C, 105 °C ja 125 °C lämpötiloissa useamman tunnin ajan. Ainostaan 40 °C lämpötilassa proantosyanidiinit pysyivät stabiileina 72 h ajan. Lämpökäsittely 8 h ajan 60–125 °C lämpötilassa aiheutti puolestaan merkittävästi proantosyanidiinipitoisuuksien vähenemistä. Noin 52–70 % alkuperäisestä proantosyanidiinipitoisuudesta oli hajonnut (Khanal *et al.*, 2010).

Cheng *et al.* (2014) tutkivat kuumen veden vaikutusta fenolihappojen sekä katekolin ja protokatekiinialdehydin stabiilisuuteen. Lämpökäsittely kesti vähintään 20 min ja lämpöä säädeltiin 100–350 °C välillä. Tutkimuksessa 200 °C vedessä fenolihapot pysyivät stabiileina suhteellisen hyvin, mutta 300–350 °C ne olivat viimeistään hajonneet kokonaan. Fenolihapot Lämpökäsittelyn seurauksena fenolihappojen sisältämät karboksyyliyhdyttimet (-COOH) hajoasivat (kuva 13).



**Kuva 12.** Fenolihdisteiden hajoaminen eri lämpötiloissa (Yan *et al.*, 2014, muokattu).

Fenolihapoista salviahappo säilyi parhaiten 250 °C lämpötilassa. Protokatekiinihappo pysyi hapoista puolestaan parhaiten stabiilina 200 °C (kuva 12). Katekoli ja protokatekiinaldehydi pysyivät puolestaan melko hyvin stabiileina jopa 250 °C lämpötilassa vaikka lämpökäsittelyaika oli pidempi kuin 60 min. Katekolin ja protokatekiinaldehydin rakenteet eivät sisällä karboksyyliiryhmää, mikä luultavasti vaikutti niiden hyvään stabiilisuuden korkeissa lämpötiloissa (Cheng *et al.*, 2014).



**Kuva 13.** Fenolihappojen hajoaminen lämpökäsittelyn aikana: Salviahappo (A), protokatekiinihappo (B), ferulahappo (C) (Yan *et al.*, 2014, muokattu).

Prosessoinnin vaikutusta ellagitanniineihin ei ole tutkittu kattavasti, mutta muutamien tulosten perusteella (Hager *et al.*, 2010) ellagitanniinien ei ole todettu hajoavan huomattavasti lämpökäsittelyn seurauksena. Ellagitanniinit ovat molekyyli­massaltaan suurempia muihin fenolihydrateisiin verrattuna, joten tämä voi vaikuttaa niiden hyvään lämpö­stabiilisuuteen.

### 5.1.2 Entsyymit

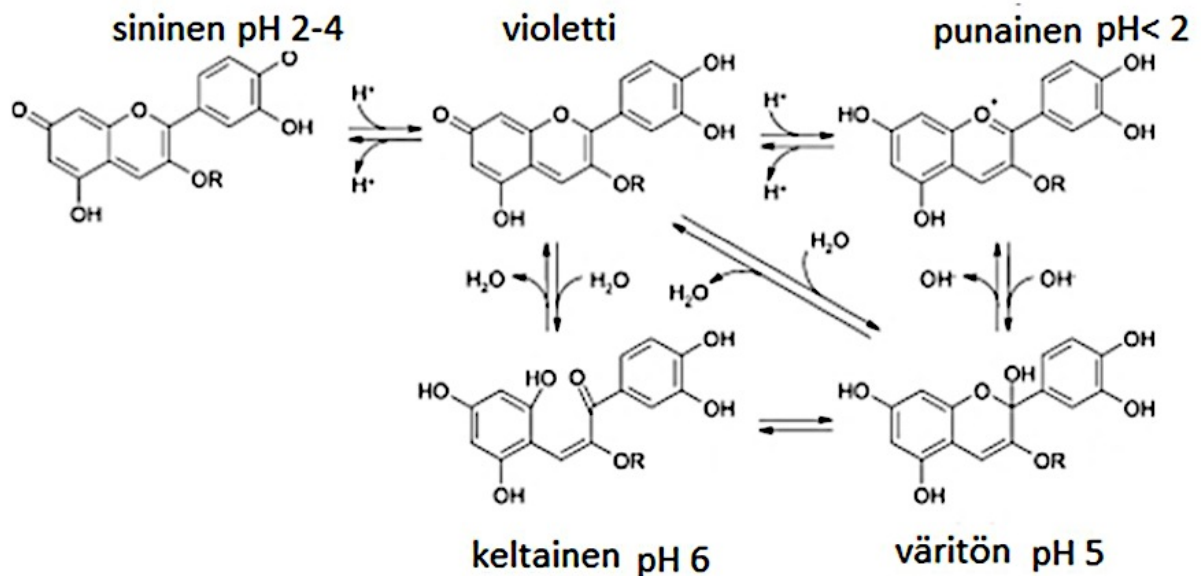
Mehujen valmistuksen puristusvaiheessa entsyymien käyttö on yleistä. Entsyymien avulla pystytään rikkomaan marjojen soluseinämien rakenne ja vapauttamaan marjoista saatavissa oleva mehu mahdollisimman tehokkaasti. Entsyymivalmisteet sisältävät usein sivuaktiivisuuksina glykosidaaseja. Nämä saattavat heikentää erityisesti antosyaanien stabiilisuutta, sillä ne irrottavat antosyaaniyhdisteen sokeriosan. Antosyaaneissa kiinni­olevien sokerimolekyylien on todettu lisäävän antosyaanien stabiilisuutta, ja pelkkä antosyanidiiniosa sellaisenaan onkin hyvin epästabiili (Wessman, 2016) Antosyaanien epästabiilisuus vähentää mehun fenolihydratepitoisuutta sekä vaikuttaa mehun väriin. Mehun valmistuksessa käytettyjen entsyymien sisältämät sivuaktiivisuudet ja niiden vaikutukset tulisi siis tuntea. Oikeilla entsyymivalinnoilla voidaan vaikuttaa huomattavasti fenolihydrateiden hajoamisen

minimoimiseen. Uusilla tekniikoilla kuten suurtehoultraäänikäsittelyllä entsyymien käyttöä voidaan myös vähentää. (Hannula, 2001; Roininen & Mokka, 2007)

### 5.1.3 pH

Prosesseissa joissa käytetään korkeaa pH:ta, fenoliyhdisteiden stabiilisuus on usein heikko. Stabiilisuus eri pH-arvoissa riippuu kuitenkin vahvasti fenoliyhdisteen rakenteesta. Flavan-3-olien, fenolihappojen ja antosyaanien on esimerkiksi todettu pysyvän stabiilisinä happamissa olosuhteissa ja hajoavan emäksisissä (Friedman ja Jürgens, 2000). Myös säilytyksen aikana matala pH on parempi vaihtoehto, sillä tuotteiden värinmuutokset aiheutuvat usein pH:n muutoksista.

Antosyaanit pysyvät parhaiten stabiileina happamissa olosuhteissa, sillä pH:n nosto korkeaksi vaikuttaa antosyaanien rakenteeseen ja tätä kautta heikentää niiden stabiilisuutta ja muuttaa niiden väriä. Kuvassa 14 on esitetty pH-arvon muutoksen vaikutus antosyaanin perusrakenteeseen. Eri pH-arvoissa antosyaanin rakenne muuttuu, jolloin myös antosyaanin väri vaihtuu. Ympäröivän liuoksen pH:n muuttuessa happamasta emäksiseksi antosyaanin väri vaihtuu siniseksi tai värittömäksi. Lisäksi antosyaani saattaa pelkistyä hyvin vahvan emäksen läsnä ollessa ja sen väri muuttuu keltaiseksi. (Motturi *et al.*, 2013)



**Kuva 14.** Flavylium-ionin (antosyaanin perusrakenteen) värin ja rakenteen riippuvuus pH:sta (Motturi *et al.*, 2013).

Friedman ja Jürgens (2000) totesivat fenoliyhdisteiden bentseenirenkaissa sijaitsevien OH-ryhmien vaikuttavan yhdisteiden stabiilisuuteen eri pH-arvoissa. OH-ryhmät reagoivat pH:n muutoksiin, jolloin niitä ollessa vähemmän fenoliyhdisteet pysyivät paremmin stabiileina korkeissa pH-arvoissa. Esimerkiksi ferulahappo pysyi stabiilina korkeassa pH:ssa, sillä sen bentseenirenkaassa sijaitsee vain yksi OH-ryhmä. Gallihapon bentseenirenkaassa on kolme OH-ryhmää ja se oli puolestaan hyvin epästabiili korkeissa pH-arvoissa. Katekiini ja epigallokatekiini eivät kuitenkaan hajonneet yhtä voimakkaasti kuin gallihappo pH:n muutoksen vaikutuksesta vaikka niiden bentseenirenkaissa sijaitsee useampi OH-ryhmä. Tämä johtui luultavasti siitä, että näiden yhdisteiden rakenteet ovat monimutkaisempia kuin esimerkiksi gallihapon (Friedman & Jürgens, 2000).

## 5.2 Stabiilisuus säilytyksen aikana

Fenoliyhdisteiden stabiilisuus säilytyksen aikana riippuu säilytysolosuhteista sekä säilytyksen pituudesta. Säilytysolosuhteilla kuten säilytyslämpötilalla, valolla, pH:lla ja hapen läsnäololla on kuitenkin suurin merkitys fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen. Mattila *et al.* (2010) totesivat tutkimuksessaan, että vanhentumispäivää lähellä olevien mustaherukkamehujen



antosyaanipitoisuus oli huomattavasti alempi kuin tuoreempien mehujen. Syynä tähän todettiin olevan säilytyksen pituus ja erilaiset säilytysolosuhteet.

Lahel *et al.* (2006) ovat todenneet lämpötilan, pH:n ja valon vaikuttavan antosyaanien stabiilisuuteen neljässä happomarjalajikkeessa säilytyksen aikana. Happomarjoista uutetut antosyaanit altistettiin eri pH-arvoille (0, 1,5, 3), lämpötiloille (5 °C, 15 °C, 25 °C, 35 °C) sekä valon läsnäololle. Tuloksissa huomattiin, että pH:n ja lämpötilan nosto korkeammaksi sekä altistus valolle heikensivät antosyaanien stabiilisuutta. Tutkimuksessa todettiin myös, että eri happomarjalajikkeet reagoivat eri tavalla eri olosuhteisiin, jolloin antosyaanien stabiilisuus riippui myös tutkitusta happomarjalajikkeesta.

Erilaisten yhdisteiden vaikutusta erityisesti antosyaanipigmenttien stabiilisuuteen on myös tutkittu säilytyksen aikana. Thakur ja Arya (1989) osoittivat sokereiden ja niiden hajoamistuotteiden heikentävän antosyaanien stabiilisuutta. Stabiilisuutta heikentävien yhdisteiden erotus on aiheellista tehdä fenoliyhdisteiden säilymisen parantamiseksi esimerkiksi adsorptiolla tai kiinteäfaasiuutolla.

Myös askorbiinihapon eli C-vitamiinin ja vetyperoksidin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on todettu nopeuttavan antosyaanien hajoamista ja vaikuttavan näin tuotteiden värinmuutoksiin säilytyksen aikana (Nikkhah *et al.* 2008). C-vitamiinia lisätään usein marja- ja hedelmämehuihin ravintoarvojen parantamiseksi sekä mehujen hapettumisen estämiseksi. Vetyperoksidia käytetään puolestaan elintarvikkeiden pakkausmateriaaleissa (Nikkhah *et al.* 2008). C-vitamiinin ja antosyaanien välisen kondensoitumisen on todettu olevan yksi hajoamiseen vaikuttavista mekanismeista (Nikkhah *et al.* 2008). Vetyperoksidin on puolestaan todettu lisäävän vapaiden radikaalien sekä kioneiden määrä, jotka heikentävät antosyaanien stabiilisuutta (Nikkhah *et al.* 2008).

### **5.2.1 Säilytyksen lämpötila**

Srivastava *et al.* (2007) tutkivat säilytysolosuhteisen vaikutusta mustikkauutteiden fenoliyhdisteiden aktiivisuuteen ja stabiilisuuteen. Kahden eri mustikkalajikkeen uutteen säilytettiin lasipulloissa noin -20 °C, 6 °C, 23 °C ja 35 °C lämpötiloissa. Taulukossa III on

esitetty Srivastavan *et al.* (2007) tutkimien mustikkauutteiden sisältämien fenolihdisteiden ja antosyaanien säilyminen eri lämpötiloissa 60 vrk aikana.

**Taulukko III** Kahden eri mustikkauutteen fenolihdisteiden ja antosyaanien säilyminen eri lämpötiloissa 60 vrk aikana (Srivastava *et al.*, 2007, muokattu).

Uute	Tifblue-mustikkauute				Powderblue-mustikkauute			
Lämpötila, °C	-20±1	6±1	23±1	35±0,5	-20±1	6±1	23±1	35±0,5
Fenolihdisteiden säilyminen, %	78,3±3,5	66,6±2,2	49,4±2,5	49,4±2,5	75,9±0,1	68,9±4,1	35,6±1,1	50,3±2,3
Antosyaanien säilyminen, %	77,8±3,1	67,5±1,1	50,4±3,5	50,7±2,3	75,4±3,5	68,5±0,4	51,3±0,6	31,3±0,5

Taulukon III tuloksista nähdään, että molempien uutteen fenolihdisteet säilyivät parhaiten -20 °C lämpötilassa. Tässä lämpötilassa fenolihdisteistä oli jäljellä noin 76–78 % vielä 60 vrk säilytyksen jälkeen. 35 °C lämpötilassa fenolihdisteitä säilyi 60 d jälkeen noin puolet alkuperäisestä pitoisuudesta (taulukko III). 6 °C ja 23 °C lämpötiloissa fenolihdisteiden pitoisuudet laskivat myös merkittävästi. Erityisesti Powderblue-mustikkauutteen fenolihdistepitoisuus laski huomattavasti (75 %) 23 °C lämpötilassa. Tuloksista voidaan siis todeta, että fenolihdisteiden stabiilisuus on vahvasti riippuvainen säilytyslämpötilasta, sillä matalimmissa säilytyslämpötiloissa fenolihdisteet pysyvät huomattavasti paremmin stabiileina. Uutteet kannattaa siis pakastaa tai säilyttää matalissa lämpötiloissa, jotta fenolihdisteet säilyvät parhaiten.

Marjojen säilytys pakastettuna on hyvä tapa säilyttää fenolihdisteiden stabiilisuus pidemmällä aikavälillä. Bakowska-Barczak ja Kolodziejczyk (2011) osoittivat kokeissaan, että mustaherukoiden antosyaanit pysyivät suhteellisen stabiileina yhdeksän kuukauden pakastamisen aikana: antosyaaneista hajosi -20 °C lämpötilassa noin 6 %. Myös hillojen ja muiden marjoista valmistettujen elintarvikkeiden pakastamisen on todettu säilyttävän fenolihdisteet parhaiten (Törrönen, 2006).

### 5.2.2 Säilytyksen pituus

Scibisz ja Mitek (2009) totesivat tutkimuksessaan, että säilytyslämpötilan lisäksi myös säilytysajan pituudella on vaikutus fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen. Tutkiessaan mustikkahilloja he huomasivat, että erityisesti antosyaanipitoisuudet laskivat säilytysajan pidentyessä. Kaksi kuukautta prosessoinnin jälkeen mustikkahillon antosyaaneista oli hajonnut noin 20 % ( $T=22\text{ °C}$ ). Kuuden kuukauden kuluttua antosyaaneja oli puolestaan hajonnut 33 % alkuperäisestä määrästä samassa lämpötilassa. Kun säilytyslämpötilana oli  $6\text{ °C}$  antosyaanien hajosivat kahdessa kuukaudessa 2 % ja kuudessa kuukaudessa 22 %. Mustikkahillon kokonaisfenoliyhdistepitoisuus laski kuuden kuukauden aikana 2 %  $6\text{ °C}$  lämpötilassa ja 18 %  $22\text{ °C}$  lämpötilassa.

Häkkinen *et al.* (2000) tutkivat säilytyksen pituuden vaikutusta kversetiini-, myrsitiini- ja kemferolipitoisuuksiin viidessä eri marjassa. Yhdeksän kuukauden säilytyksen jälkeen  $-20\text{ °C}$  kversetiinipitoisuus oli laskenut 40 % mustikassa ja puolukassa. Sen sijaan mustaherukan ja vadelman kversetiinipitoisuuksissa ei tapahtunut muutosta. Myrsitiini- ja kemferolipitoisuuksissa ei havaittu juurikaan vähenemistä yhdeksän kuukauden aikana missään marjassa (Häkkinen *et al.*, 2000).

### 5.2.3 Valo

Voimakas valo saattaa aiheuttaa kasveille valostressiä jos altistumisaika valolle on pitkä. Tällöin primääristen yhteyttämistuotteiden muodostus heikkenee ja samalla tämä vaikuttaa epäsuorasti fenoliyhdisteiden pitoisuuksiin kasveissa (Hyvärinen, 2001). Esimerkiksi fenoliyhdisteiden kuivausta ei kannata tehdä suorassa auringon valossa. Mitzuno *et al.* (1992) totesivat vapaan kversetiinin hajoavan nopeasti auringon valossa. Puolet kversetiinistä oli hajonnut 48 tunnissa kun se altistettiin voimakkuudeltaan 15 000 lx valolle. Kversetiini kesti voimakkuudeltaan 12 000 lx valossa noin 8 tuntia ennen nopeaa hajoamista.

Mustaherukkamehujen antosyaanien todettiin hajoavan toisen kertaluvun reaktiokinetiikan mukaisesti, kun ne altistettiin valolle (Contreras-Lopez *et al.*, 2013). Pakkausmateriaaleilla pystytään vaikuttamaan siihen, että valo ei kohdistu suoraan tuotteiden fenoliyhdisteisiin.

Mustaherukkamehujen antosyaanit säilyisivät esimerkiksi parhaiten tummissa pulloissa (Contreras-Lopez *et al.*, 2013).

#### **5.2.4 Värimuutokset**

Värimuutokset säilytyksen aikana johtuvat pH:n vaikutuksesta esimerkiksi antosyaaneihin. Flavonoidien ja antosyaanien väriainekäyttö on osittain ongelmallista, sillä ne reagoivat helposti pH:n vaihteluihin. Värin voimakkuuteen ja häviämiseen vaikuttavat pH:n lisäksi valo, lämpötila sekä hapen läsnäolo (Hyvärinen, 2001). Flavonoideja käytetään yleensä elintarvikkeiden väriaineina, mutta väriteollisuudessa niiden käyttö on vähäistä mahdollisten värimuutosten takia (Motturi *et al.*, 2013).

Elintarvikkeissa havaitaan myös entsyymaattista ja ei-entsyymaattista ruskettumista. Ruskettumisreaktio aiheuttaa muutoksia elintarvikkeen väriin, makuun, hajuun ja rakenteeseen. Ruskettumista tapahtuu erityisesti elintarvikkeiden, kuten hedelmien vanhetessa ja vahingoittuessa. Lisäksi erilaiset prosessoinnit, kuten murskaus ja pilkkominen aiheuttavat ruskettumista. Ruskettumisen nopeus riippuu esimerkiksi fenoliyhdistepitoisuudesta, pH:sta, lämpötilasta, fenolioksidaasien aktiivisuudesta sekä antioksidanttien määrästä (Hyvärinen, 2001). Rusketusreaktioita voidaan estää näitä säätelämällä. Esimerkiksi pH:n ja fenolioksidaasien aktiivisuuden alentaminen, hapen poisto sekä fenoliyhdisteiden pitoisuuden vähentäminen hidastavat rusketusreaktioita (Hyvärinen, 2001).

## **6 Yhteenveto fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen vaikuttavista tekijöistä**

Fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen vaikuttaa olennaisesti lämpötila, pH, valon määrä ja hapen läsnäolo. Nämä tekijät voivat vaikuttaa fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen sekä prosessoinnin että säilytyksen aikana. Stabiilisuus on vahvasti riippuvainen myös yhdisteen rakenteesta ja pH:n vaikutuksesta fenoliyhdisteen rakenteeseen. Joidenkin fenoliyhdisteiden rakenteet kestävät esimerkiksi paremmin korkeita lämpötiloja ja pH:n vaihteluita. Erilaisten olosuhteiden lisäksi prosessoinnin ja säilytyksen aikana on tärkeä tiedostaa, miten muut yhdisteet vaikuttavat fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen.

Taulukossa IV on esitetty yleisimpiä tapoja, joilla fenoliyhdisteiden hajoamista voidaan vähentää ja stabiilisuutta parantaa prosessoinnin ja säilytyksen aikana. Olosuhteet tulisi optimoida jokaiselle eri marjalajikkeelle, sillä toiset marjat tarvitsevat esimerkiksi korkeamman lämpötilan ja vahvemman entsyymikäsittelyn prosessoinnin aikana kuin toiset. Paras tapa säilyttää fenoliyhdisteet on pitää myös lämpökäsittelyn ja säilytyksen kestot lyhyinä. Esimerkiksi mustikan sisältämät antosyaanit säilyvät parhaiten 100 °C prosessointilämpötilassa noin 20 min ajan. Prosessoidut tuotteet kuten mustikkahillot kannattaa säilyttää noin 6 °C lämpötilassa ja pitkällä säilytysajalla pakastettuna, jotta antosyaanien hajoamista tapahtuu mahdollisimman vähän. Antosyaaneja sisältävien tuotteiden värinmuutoksia voidaan estää pitämällä pH matalana ja suojaamalla yhdisteet hapelta sekä valolta. Sokereiden poisto lisää myös antosyaanien stabiilisuutta. Antosyaaneja sisältävistä tuotteista sokerit voidaan poistaa esimerkiksi adsorptiolla tai kiinteäfaasiuutolla.

**Taulukko IV** Fenoliyhdisteiden hajoamisen minimointi ja stabiilisuuden parantaminen.

Prosessoinnin aikana	Säilytyksen aikana
<ul style="list-style-type: none"> <li>• optimoidut prosessiolosuhteet jokaiselle marjalajikkeelle</li> <li>• marjojen murskauksen jälkeen heti muu prosessointi               <ul style="list-style-type: none"> <li>➔ hapen vaikutuksen minimointi</li> </ul> </li> <li>• sopivat entsyymivalinnat</li> <li>• lyhyt prosessointiaika matalassa lämpötilassa               <ul style="list-style-type: none"> <li>➔ vaihtoehtoisesti hyvin korkea lämpötila ja lyhyt prosessointi</li> </ul> </li> <li>• matala pH-arvo</li> <li>• suojaaminen valolta, ei kuivausta auringon valossa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• lyhyt säilytysaika</li> <li>• matala lämpötila               <ul style="list-style-type: none"> <li>➔ pakastaminen paras vaihtoehto pitkälle säilytysajalle</li> </ul> </li> <li>• suojaaminen valolta</li> <li>• suojaaminen hapelta</li> <li>• tiedostaminen muiden yhdisteiden vaikutuksista fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen               <ul style="list-style-type: none"> <li>➔ muiden yhdisteiden erotus fenoliyhdisteistä</li> </ul> </li> <li>• matala pH-arvo               <ul style="list-style-type: none"> <li>➔ värinmuutosten esto</li> </ul> </li> </ul>

## 7 Johtopäätökset

Fenoliyhdisteet ovat kasveissa syntyviä aineenvaihduntatuotteita, joilla on todettu olevan positiivisia terveysvaikutuksia. Fenoliyhdisteiden terveysvaikutukset perustuvat erityisesti niiden antioksidanttisiin ominaisuuksiin. Suomalaiset marjat ovat ylivoimaisesti parhaita fenoliyhdisteiden lähteitä muihin elintarvikkeisiin verrattuna. Marjoissa esiintyy etenkin fenolisiin yhdisteisiin kuuluvia antosyaaneja, flavonoleja, flavanoleja, fenolihappoja, ellagitanniineja ja proantosyanidiineja. Näiden yhdisteiden pitoisuudet vaihtelevat kuitenkin marjalajikekohtaisesti.

Fenoliyhdisteet ovat suhteellisen reaktiivisia ja epästabiileja yhdisteistä. Prosessoinnilla ja säilytyksellä on suuri merkitys fenoliyhdisteiden stabiilisuuteen. Erilaisten tutkimusten perusteella voidaan todeta, että etenkin korkea lämpötila ja pH sekä suuri valon määrä vaikuttavat fenoliyhdisteiden hajoamiseen ja epästabiilisuuteen. Prosessoinnin ja säilytyksen aikana lämpötila ja pH olisi hyvä pitää matalana ja minimoida valon määrä. Lämpökäsittely tulisi suorittaa myös mahdollisimman lyhyessä ajassa. Pitkällä aikavälillä säilytys olisi hyvä tehdä pakastettuna. Prosessoinnin ja säilytyksen aiheuttamien tarkkojen vaikutusten yleistäminen kaikkiin fenoliyhdisteisiin on kuitenkin suhteellisen hankalaa näiden rakenteellisten erojen takia.

Tällä hetkellä erityisesti antosyaanien stabiilisuutta on tutkittu yksityiskohtaisemmin ja esimerkiksi monien erilaisten yhdisteiden vaikutus antosyaanien stabiilisuuteen tunnetaan. Tutkimusta olisi hyvä laajentaa myös tarkemmin muihin tunnetuimpiin fenoliyhdisteisiin. Tätä tietoa pystyttäisiin hyödyntämään elintarvike-, lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa, joissa marjoista jalostetaan erilaisia tuotteita. Näillä teollisuuden aloilla prosessointi ja säilytys voitaisiin toteuttaa paremmin niin, että fenoliyhdisteet päätyvät erilaisiin lopputuotteisiin ja pysyvät niissä stabiileina.

## LÄHDELUETTELO

- Airaksinen, J., 2006. Marjojen antosyaanien erottaminen ja väkevöinti. Diplomityö. Kemiantekniikan osasto, Lappeenrannan teknillinen yliopisto.
- Arancibia-Avila, A., Namiesnik, J., Toledo, F., Werner, E., Martinez-Ayala, AL., Rocha-Gumán, NE., Gallegos-Infante, JA., Gorinstein, S., 2011. The influence of different time durations of thermal processing on berries quality. *Food Control*, 26: 587-593.
- Arktiset Aromit, 2016. Marjasanasto. [Verkkodokumentti]. [Viitattu 15.2.2016]. Saatavilla <http://www.arktisetaromit.fi/fi/arktiset+aromit/marjat/marjasanasto/> - k
- Bakowska-Barczak, AM. & Kolodziejczyk PP., 2011. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, 34: 1301-1309.
- Cheng, Y., Xu, Q., Zhao, C., Xue, F., Zhao, Y., 2014. Decomposition of five phenolic compounds in high temperature water. *J. Braz. Chem. Soc.* vol. 25 no. 11.
- Fineli, 2016. Terveysten ja hyvinvoinninlaitoksen ylläpitämä elintarvikkeiden kansallinen koostumustietopankki. [Verkkodokumentti]. [Viitattu 21.2.2016]. Saatavilla <https://fineli.fi/fineli/fi/index>
- Friedman, M. & Jürgens HS., 2000. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem*, 48: 2101-2110.
- Guiné, RPF. & Barroca, MJ., 2014. Influence of processing and storage on fruit juices phenolic compounds. *International Journal of Medical and Biological Frontiers*, 20(1): 45-58.
- Hager, TF., Howard, LR., Prior, RL., 2010. Processing and Storage Effects on the Ellagitannins Composition of Processed Blackberry Products. *J. Agric. Food Chem*, 58: 11749-11754.
- Hannula, M., 2001. Marjojen flavonoidien uuttaminen. Diplomityö. Kemiantekniikan osasto, Lappeenrannan teknillinen korkeakoulu.



- Hellström, JK., Törrönen, AR., Mattila, PH., 2009. Proanthocyanidins in Common Food Products of Plant Origin. *J. Agric. Food Chem*, 57: 7899-7906.
- Hertog, MGL. & Katan, MB., 1998. Quercetin in foods, cardiovascular disease, and cancer. In *Flavonoids in Health and Disease*, eds., C.A. Rice-Evans and L. Packer. Marcel Dekker, Inc., New York. s.447-446.
- Howard, LR., Priot, RL., Liyanage, R., Lay, JO., 2012. Processing and Storage Effect on Berry Polyphenols: Challenges and Implications for Bioactive Properties. *J. Agric. Food Chem*, 60: 6678-6693.
- Häkkinen, SH., Kärenlampi, SO., Heinonen IM., Mykkänen HM., Törrönen AR., 1999. Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries. *J. Agric. Food Chem*, 47: 2274-2279.
- Häkkinen, S., 2000. *Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products*. Väitöskirja. Lääketieteellinen tiedekunta, Kuopion yliopisto.
- Häkkinen SH., Kärenlampi, SO., Mykkänen, HM., Törrönen RA., 2000. Influence of Domestic Processing and Storage on Flavonol Contents in Berries. *J. Agric. Food Chem*, 48: 2960-2965.
- Hyvärinen, H., 2001. *Kasviperäiset biomolekyylit – fenoliset yhdisteet ja terpeenit*. Kirjallisuuskatsaus. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT).
- Khanal, RC., Howard LR., Prior RL., 2010. Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*, 43: 1464-1469.
- Kähkönen, MP., Hopia, AI., Heinonen, M., 2001. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem*, 49: 4076-4082.

Laleh, GH., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R., Zare, S., 2006. Effect of Light, Temperature, pH and Species on Stability of Anthocyanin Pigment in Four Berberis Species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5(1): 90-92.

Landete, J.M., 2011. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Review. Food Research International*, 44: 1150-1160.

Linus Pauling Institute, 2016. Micronutrient Information Center: Flavonoids, Oregon State University. [Verkkodokumentti]. [Viitattu 21.2.2016]. Saatavilla <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids#figure-7>

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billiot, J., 1990. *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, Florida. s.39-54.

Mattila, P. & Törrönen, R., 2006. Marjoista saa runsaasti hyödyllisiä fenoliyhdisteitä. *Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT). 63. vuosikerta. Numero 2. s. 11.*

Mitzuno, M., Tsuchida, H., Kozukue, N., Mizuno, S., 1992. Rapid quantitative analysis and distribution of free quercetin in vegetables and fruits. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39(1): 88-92.

Motturi, H., Slawuta, S., Salkunen, S., Rajala, P., 2013. Kasvien väriaineet pH-indikaattoreina ruoanvalmistuksessa. *LUMAT* 1(2).

Myllymäki, O., Morkkila, M., Sainio T., 2007. Selvitys marjojen fenolisten yhdisteiden eristämisen teknologiasta. *Valtion teknillinen tutkimuskeskus (VTT) & Suomen itsenäisyyden juhlarahasto (Sitra).*

Nikkah, E., Khaiamy M., Heidary, R., Azar, AS., 2008. The effect of ascorbic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment on the stability of anthocyanin pigments in berries. *Turk. J. Biol.*, 34: 47-53.

Pietta, PG., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63: 1035-1042.

- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H., Oksman-Caldentey, K., 2004. Bioactive berry compounds – novel tools against human pathogens. Mini-review. *Applied Microbiological Biotechnology*, 67: 8-18.
- Riihinen, K., 2005. Phenolic compounds in berries. Väitöskirja. Ravitsemustieteellinen tiedekunta, Kuopion yliopisto.
- Roininen, K. & Mokka, M., 2007. Selvitys marjonen ja marjasivuvirtojen hyödyntämispotentiaalista Suomessa. Valtion teknillinen tutkimuskeskus (VTT) & Suomen itsenäisyyden juhlarahasto (Sitra).
- Schwartz, S. J., von Elbe, J. H., Giusti M. M., 2008. Colorants. *Fennema's Food Chemistry* 4th edition. Chapter 9. s. 599-613.
- Scibisz, I. & Mitek M., 2009. Effect of processing and storage conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of highbush blueberry jams. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1: 45-52.
- Srivastava, A., Akoh C. C., Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., 2007. Effect of Storage Conditions on the Biological Activity of Phenolic Compounds of Blueberry Extract Packed in Glass Bottles. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 2705-2713.
- Thakur, BR. & Arya, SS., 1989. Studies on Stability of Blue Grape Anthocyanins. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 24: 321-326.
- Tuomela, H., Tikkanen-Kaukanen, C., Rutanen, J., 2013. Luonnontuotteiden kemialliset yhdisteet. Raportteja 113. Rurallia-instituutti, Helsingin yliopisto.
- Törrönen, R. & Riihinen, K., 2004. Marjat arvokkaita polyfenolien lähteitä. *Kehittyvä Elintarvike*. [Verkkodokumentti]. [Viitattu 15.2.2016]. Saatavilla <http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/12-marjat-arvokkaita-polyfenolien-lahteita>

Törrönen, R., 2006. Tutkimustietoa marjojen terveellisyydestä ja terveysvaikutuksista. Elintarvikkeiden terveysvaikutusten tutkimuskeskus (ETTK), Kliinisen ravitsemuksen yksikkö, Kuopion yliopisto.

Wessman, I., 2016. Aronian antosyaanien aineenvaihduntatuotteet ja niiden analytiikka. Maisterintutkielma. Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto.

Yingjian L. & Devanand, L., 2014. Influence of Postharvest Storage, Processing, and Extraction Methods on the Analysis of Phenolic Phytochemicals. Bestville Human Nutrition Research Center. U.S Department of Agriculture.