

**Kasvupaikan sijainnin ja lämpötilan vaikutus  
puolukan (*Vaccinium vitis-idaea*) haihtuviin  
yhdisteisiin**

Pro gradu -tutkielma  
Turun yliopisto  
Bioteknologian laitos  
Molekyylibiotieteiden tutkinto-ohjelma  
Helmikuu 2023

Sanni Tuominen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

SANNI TUOMINEN: Kasvupaikan sijainnin ja lämpötilan vaikutus puolukan (*Vaccinium vitis-idaea*) haihtuviin yhdisteisiin

Pro gradu -tutkielma, 51 s., 7 liites.

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Helmikuu 2023

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

---

Monikäyttöinen puolukka eli *Vaccinium vitis-idaea* ei ole maailmalla yhtä suosittu kuin pohjoismaissa. Suomessa puolukkaa poimitaan vuosittain jopa 100 miljoonaa kiloa, mutta myyntiin päätyy keskimäärin 4,7 miljoonaa kiloa. Puolukan kaupallinen viljely on vähäistä: maailmanlaajuisesti vain 71 hehtaarilla kasvaa puolukkaa. Puolukan happamuus tekee siitä haastavan elintarvikkeen, ja siksi puolukkaan liittyvää tutkimusta on tehty suhteellisen vähän muihin marjoihin verrattuna. Hapan puolukka kuitenkin säilyy hyvin sen sisältämän bentsoehapon ansiosta ja sisältää lisäksi C-vitamiinia sekä hivennäis- ja kivennäisaineita.

Marjan aromiprofiili muodostuu haihtuvista orgaanisista yhdisteistä, kuten estereistä, aldehydeistä, alkoholeista ja terpeeneistä. Työssä uutettiin haihtuvia yhdisteitä norjalaisista ja suomalaisista puolukoista kiinteäfaasiuutto-tekniikkaa hyödyntäen. Uuton jälkeen yhdisteet analysoitiin kaasukromatografimassaspektrometrillä (GC-MS). Norjalaisia näytteitä oli kahta eri tyyppiä: kasvuhuoneessa 9 °C ja 15 °C kasvatettuja puolukoita sekä viiden eri kypsyyssasteen puolukoita kahdelta eri paikkakunnalta (Ås ja Tromssa). Kasvuhuone tarkoittaa hallittua kasvuympäristöä, jossa muun muassa kasvulämpötila ylläpidetään tasaisena koko kasvun ajan. Tutkimuksen tarkoituksena oli kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti kartoittaa puolukan haihtuvat yhdisteet sekä selvittää lämpötilan, kasvupaikan ja kypsyyssasteen vaikutus.

Haihtuvia yhdisteitä tunnistettiin kokonaisuudessaan 60. Bentsoehappo oli runsain yhdiste suurimmassa osassa näytteitä ja sen pitoisuus nousi marjan kypsymisen edetessä. Kypsemmistä näytteistä löytyi myös etanolia ja alkoholien hajoamistuotteita. Näytteistä löydettiin lisäksi muita tuoksuvia yhdisteitä, kuten linaloolia, joka tuoksuu kukkaiselta ja yrttimäisen tuoksuista eukalyptolia. Vihreän tuoksuiset heksanaali, 2-heksanaali, 3-heksanaali ja 1-heksanoli olivat bentsoehapon ohella runsaimpia haihtuvia yhdisteitä puolukassa. 9°C:ssa kasvaneista marjoista löytyi vähemmän bentsoehappoa, mutta enemmän heksanaalia, 2- ja 3-heksenalia kuin 15 °C:ssa kasvaneista.

Avainsanat: puolukka, haihtuva yhdiste, lämpötila, sijainti, kypsyyssaste, SPME, GC-MS, aromiprofiili

*Ut sementem feceris, ita metes*

# Sisällys

Lyhenteet.....	1
1 Johdanto.....	2
1.1 Haihtuvat yhdisteet.....	2
1.2 Haihtuvien yhdisteiden metabolia .....	3
1.1.1 Terpeenit.....	4
1.1.2 Esterit .....	6
1.1.3 Aldehydit.....	7
1.1.4 Lipidit haihtuvien yhdisteiden esiasteena .....	7
1.2 Puolukka, <i>Vaccinium vitis-idaea</i> .....	7
1.2.1 Puolukan yhdisteiden bioaktiivisuus.....	8
1.2.2 Puolukan haihtuvat yhdisteet .....	9
1.3 Muiden <i>Vaccinium</i> -marjojen ja mustaherukan haihtuvat yhdisteet.....	10
1.3.1 Kangasmustikka, <i>Vaccinium myrtillus L.</i> ja muut mustikat .....	10
1.3.2 Karpalo, <i>Vaccinium macrocarpon</i> ja <i>oxycoccus L.</i> ....	12
1.3.3 Mustaherukka, <i>Ribes nigrum.</i> ....	14
1.4 Kasvuolosuhteiden vaikutus haihtuviin yhdisteisiin .....	15
1.4.1 Puolukka, <i>Vaccinium vitis-idaea</i> .....	15
1.4.2 Kangasmustikka, <i>Vaccinium myrtillus L</i> ja muut mustikat .....	16
1.4.3 Mustaherukka, <i>Ribes nigrum</i> .....	17
1.5 Kypsyysasteen vaikutus haihtuviin yhdisteisiin marjoissa.....	17
1.5.1 Mustaherukka, <i>Ribes nigrum</i> .....	18
1.5.2 Mustikka, <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	18
1.5.3 Mansikat, <i>Fragaria</i> .....	19
1.6 Olosuhteiden vaikutus haihtuviin yhdisteisiin keräyksen jälkeen .....	20
1.6.1 Mustaherukka, <i>Ribes nigrum</i> .....	20
1.6.2 Vadelma, <i>Rubus idaeus</i> .....	21
1.7 Marjojen käsittelyn vaikutus haihtuviin yhdisteisiin.....	22
1.8 Tutkimuksen tarkoitus .....	23
2 Materiaalit ja menetelmät .....	25
2.1 Näytteiden hankinta ja alkuperä .....	25
2.2 Näytteiden valmistaminen ja GC-MS –ajo .....	27
2.3 Yhdisteiden tunnistus ja varmistus.....	27
3 Tulokset .....	28
3.1 Haihtuvien yhdisteiden kvantitointi ja kvalitointi SPME-GC/MS:lla .....	28
3.2 Fytotroninäytteet: 9 °C ja 15 °C.....	33

3.3 Kypsyysasteen vaikutus haihtuviin yhdisteisiin.....	39
4 Tulosten pohdinta .....	48
5 Yhteenveto.....	50
6 Lähteet.....	52

## Lyhenteet

GC-MS	engl. <i>gas chromatography–mass spectrometry</i> , kaasukromatografi-massaspektrometria
OAV	engl. <i>odor activity value</i> , “tuoksun aktiivisuusarvo”
SPME	engl. <i>solid-phase microextraction</i> , kiinteäfaasiuutto
VOC	engl. <i>volatile organic compounds</i> , haihtuvat orgaaniset yhdisteet
MVA	engl. <i>mevalonic acid</i> , mevalonihappo
MEP	engl. <i>methylerythritol phosphate</i> , metyylierytritoli
DMAPP	engl. <i>prenyl diphosphates dimethylallyl diphosphate</i> , dimetyyliallyylipyrofosfaatti
GPP	engl. <i>geranyl diphosphate</i> , geranyylipyrofosfaatti
OPP	engl. <i>diphosphate</i> , difosfaatti
LOX	engl. <i>lipoxygenase</i> , lipoksygenaasi

# 1 Johdanto

## 1.1 Haihtuvat yhdisteet

Haihtuvat yhdisteet ovat osa kasvien tuottamia sekundaarisia metaboliitteja eli aineenvaihdunnan tuotteita, joita kasvi käyttää muun muassa puolustukseen ja pölyttäjien houkutteluun (Berenbaum, 1995). Niiden kirjoon ja määrään kasvissa vaikuttaa kasvupaikka, vuodenaika, kasvin ikä, kypsyysaste ja lajike sekä käsittely ja säilytys (Beaulieu, Stein-Chisholm ja Boykin, 2014). Haihtuvien yhdisteiden luokkia on lukuisia, mutta yleensä marjan tai hedelmän tuoksuun vaikuttaa voimakkaimmin terpeenit, esterit, aldehydit, ketonit ja alkoholit. Haihtuvat yhdisteet jaetaan hallitseviin (engl. *major compound*) ja vähäisiin yhdisteisiin (engl. *minor compound*). Hallitsevalla yhdisteellä tarkoitetaan yhdistettä, jota esiintyy runsaimmin ja vähäistä yhdistettä nimensä mukaisesti esiintyy vähän. Tulee kuitenkin huomioida, että yhdisteen konsentraatio ei kerro sen aistittavuudesta. Vähäisiä yhdisteitä saattaa esiintyä alhaisissa konsentraatioissa, mutta ne voivat silti vaikuttaa olennaisesti marjan tai hedelmän tuoksuun. (Hui ja muut 2010.) Usein marjan tai hedelmän ominaistuoksuun ja -makuun merkittävästi vaikuttavia yhdisteitä ovat pienissä määrissä esiintyvät esterit ja terpeenit.

Marjojen viljelyssä keskitytään usein tuoksun sijaan maun parantamiseen, vaikka haihtuvat yhdisteet vaikuttavat ajoittain merkitsevästi makuaistimukseen (Small, 2012; Sater ja muut 2020). Marjan ja hedelmän makuun vaikuttaa sokerien, happojen ja suolojen lisäksi erilaiset haihtuvat tuoksuvat yhdisteet, joilla on niin sanottua aromiaktiivisuutta (engl. *aromatic activity*) (Hui ja muut 2010). Haihtuvat yhdisteet eli *volatile organic compounds* (VOC) muodostavat marjan tuoksuprofiilin (engl. *volatome*) ja vaikuttavat samalla myös makuelämykseen nenäontelon hajureseptorien kautta. Ruoan haihtuvat yhdisteet kulkeutuvat suusta nenäonteloon ja takaisin, hienosäätäen maistuvien yhdisteiden flavoria eli makua. Ruoan kautta aistittujen tuoksuvien yhdisteiden haistamista kutsutaan retronasaaliseksi hajuaistiksi. Tällöin ruoasta haihtuvat yhdisteet kulkevat pureskelun yhteydessä kitalaen taakse ja sieltä nenäonteloon. Tuoksuvien



yhdisteiden kiinnittyminen nenäontelon reseptoreihin puolestaan synnyttää olfaktorisen aistimuksen eli hajuaistin. (Small 2012; Gilbert ja muut 2015.)

Jokaisella haihtuvalla yhdisteellä on sille ominainen raja-arvo, jonka alapuolella ihminen ei pysty enää aistimaan tuoksua. Tuoksun aktiivisuusarvo (engl. *odor activity value*, OAV) taas kertoo kuinka paljon kyseinen yhdiste vaikuttaa näytteen kokonaistuoksuun. Tuoksun aistimiseen vaikuttaa myös yksilön olfaktorinen fenotyyppi eli perimän määrittelemä tuoksureseptorien kokonaisuus. (Hasin-Brumshtein, Lancet ja Olender, 2009.) Tuoksun voimakkuus on siis muutakin kuin korkea konsentraatio. Haihtuvat yhdisteet voivat olla myös hajuttomia. Nämä kaikki tekijät luovat haasteita haihtuvien yhdisteiden tutkimisessa. Maun ja tuoksun profiloinnin kannalta olisi tärkeätä tutkia haihtuvia yhdisteitä ja niiden OAV:n ja aromiaktiivisuuden vahvuutta. Tuoksun aistiminen ja kokeminen on kuitenkin henkilökohtaista: hajuaisti on tulos 400:n eri hajureseptorin yhteistyöstä ja niitä koodaavista geeneistä. (Niimura, 2012.)

Haihtuvien yhdisteiden tunnistamiseen vaikuttaa valittu menetelmä. Kaasukromatografia-massaspektrometri (engl. GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*) on yleisesti suosituin menetelmä, mutta silläkin on rajoituksensa. Yhdisteet saattavat eluoitua samoihin aikoihin tai jäädä havainnointirajojen ulkopuolelle. (Elmore, 2015.)

## 1.2 Haihtuvien yhdisteiden metabolia

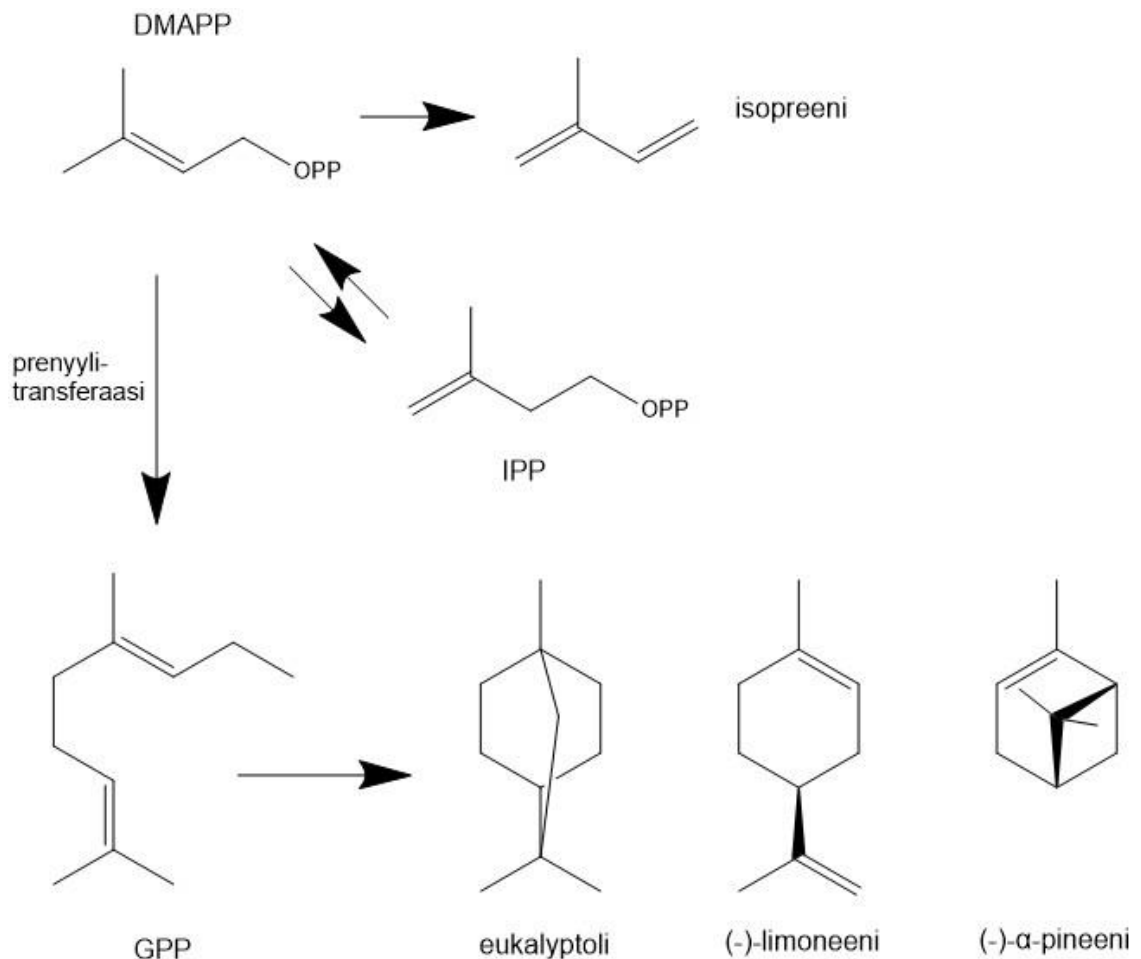
Kasvit tuottavat muiden yhdisteiden ohella haihtuvia yhdisteitä osana sekundaarista metaboliaa. Sekundaarisilla yhdisteillä on laaja kirjo tehtäviä kasvin puolustuksesta lisääntymiskelpoisuuden parantamiseen. (Singh ja muut 2006.) Nimensä mukaisesti nämä yhdisteet toimivat organismin aineenvaihdunnan toissijaisissa tehtävissä ja niiden määrää säätelee ympäristö ja kasvin kehitys (Berenbaum, 1995). Haihtuvat yhdisteet voidaan myös luokitella primaarisiksi tai sekundaarisiksi niiden esiintymisen mukaan. Primaariset yhdisteet ovat läsnä ehjässä hedelmässä, kun taas sekundaarisia yhdisteitä syntyy vasta soluvaurion myötä. Yhdisteiden määrittämiseen vaikuttaa siis tutkiiko ehjää vai murskattua hedelmää tai marjaa ja tuoksuprofiili voi näin olla hyvinkin erilainen. Haihtuvat yhdisteet voidaan erotella niiden aineenvaihdunnanreittien mukaan: rasvahappojen hapettuminen,

aminohappojen metabolia sekä terpeenien ja fenolien synteesi toimivat kaikki esiasteina haihtuville yhdisteille (Hui ja muut 2010).

### 1.1.1 Terpeenit

Terpeenit ovat laaja ja kirjava ryhmä yhdisteitä, jotka muodostuvat kahdesta tai useammasta isopreeniyksiköstä ( $C_5H_8$ ). Tämän viisihiilisen isopreeniyksikön eli hemiterpeenin esiasteena on joko mevalonihappo (engl. *mevalonic acid*, MVA) tai metyylierytritoli fosfaatti (engl. *methylerythritol phosphate*, MEP). Kasveissa isopreenien synteesi tapahtuukin joko MVA- tai MEP-aineenvaihduntareitin kautta. (Dudareva ja muut 2013.) Isopreeniyksiköiden määrä kertoo mihin alaryhmään terpeeni kuuluu: monoterpeeneissä on kaksi isopreeniyksikköä ( $C_{10}$ ), seskviterpeeneissä kolme ( $C_{15}$ ) ja niin edelleen yli kahdeksan isopreeniyksikköä sisältäviin polyterpeeneihin ( $C_{40}$ ) asti. MVA-reitin kautta syntyy seskviterpeenejä ja MEP-reitin kautta puolestaan hemi-, mono- ja diterpeenejä. Kuviossa 1 on esitetty monoterpeenien synteesi MEP-reittiä pitkin yhdisteestä dimetyyliallylipyrofosfaatti (engl. *prenyl diphosphates dimethylallyl diphosphate* eli DMAPP). Prenyylitransferaasi katalysoi reaktiota, jossa se yhdistää DMAPP:n yhden tai useamman isopentenyylipyrofostaatin (engl. *isopentyl diphosphate*, IPP) kanssa. Reaktio tuottaa geranyylipyrofosfaatin, jonka kasvi muokkaa erilaisiksi monoterpeeneiksi. (Tholl, 2006.) Kuviossa 1 esitetty 1,8-sineolin eli eukalyptolin, (-)-limoneenin ja (-)- $\alpha$ -pineenin rakenteet.

Isopreeniyhdisteitä on tunnistettu jo yli 35 000, mutta vain pieni osa näistä on haihtuvia yhdisteitä. Haihtuvia terpeenejä ovat hemi-, homo-, mono- ja seskviterpeenit sekä poikkeavat terpeenit (engl. *irregular terpene*), joissa hiilien määrä ei ole viidellä jaollinen. (Loreto ja muut 2014; Dudareva ja muut 2013.)



KUVIO 1. Monoterpeenien synteesi dimetyyliallyylipyrofosfaatista (DMAPP). Prenyylitransferaasi katalysoi DMAPP:n ja yhden tai useamman isopentenyliipirofosfaatin (IPP) reaktiota. Reaktio tuottaa geranyyliipirofosfaattia, joka voidaan muokata erilaisiksi monoterpeeneiksi. Muokattu Dorothea Tholl kuvasta kasviterpeenien muodostuminen (Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism, 2006).

Kasvit syntetisoivat terpeenejä useisiin eri käyttötarkoituksiin: sekundaarisen aineenvaihdunnan tuotteina terpeenit toimivat kasvin puolustuksessa, soluviestinnässä, lisääntymisessä ja lukuisissa muissa tehtävissä abioottisessa ja bioottisessa vasteessa. Terpeeneillä on tärkeä osa myös kasvin primäärisessä aineenvaihdunnassa (Tetali, 2019). Aineenvaihdunnan tehtävien lisäksi terpeeneillä on huomattava vaikutus marjan tuoksuprofiiliin. Vuonna 1992 tehdyssä kirjallisuuskatsauksessa haihtuvista kukkaistuoksuisista yhdisteistä todettiin isopreenien olevan yksi suurimmista kukkaistuoksun omaavista yhdisteluokista. Erityisesti yhdisteitä limoneeni, myrseeni, linanooli,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -

pineeni, osimeenit ja eukalyptoli esiintyi runsaasti. (Knudsen, Tollsten ja Bergström, 1993.) Puolukan marjojen tiedetään sisältävän muun muassa limoneenia, eukalyptolia, linaloolia ja pinenejä (Viljanen ja muut 2014). Kaikki terpeenit eivät ole pelkässä hiilivety muodossa, vaan suurimmassa osassa rakenteesta löytyy happiatomi. Lukuisat terpeenialkoholit, -aldehydit, -ketonit ja -esterit muodostavat laajan kirjon eri tuoksuja. (Yang ja muut 2020.) Terpeenejä käytetäänkin niin hajuvesissä ja hygieniatuotteissa kuin elintarvikkeissa. Esimerkiksi sitrushedelmän tuoksuisia monoterpeenejä kuten limoneenia ja linaloolia käytetään sitruunan ja limen makuisissa virvoitusjuomissa. (Hausch, Lorjaroenphon ja Cadwallader, 2015.) Monoterpeenit on todettu toimivaksi indikaattoriksi hedelmien ja marjojen kypsyiden, tuoreuden ja maantieteellisen alkuperän määrittelyssä (Chmiel ja muut 2017). Haihtuvien terpeenien määrän nousu hedelmän kypsyessä on todettu muun muassa *V. virgatumissa* (Pohjois-Amerikkalainen mustikka) ja *Mangifera indica L.* eli mangossa (Chmiel ja muut 2017; Beaulieu and Lea, 2003).

Terpeenit ovat bioaktiivisia yhdisteitä antioksidatiivisen luonteensa takia (Singh ja muut 2006) ja niillä tiedetään olevan anti-inflammatorisia, -bakteerisia ja -viraalisia. Näiden lisäksi terpeeneistä saattaa olla apua sydän- ja verisuonitautien sekä diabeteksen hoidossa (Yang ja muut 2020). Korkeat antioksidatiiviset aktiivisuudet todettiin yhdisteillä  $\gamma$ -terpineeni, terpinoleeni,  $\alpha$ -terpineoli ja terpinen-4-oli. (R)-(-)-linaloolin antioksidatiivinen aktiivisuus oli puolestaan vain neljäsosa  $\gamma$ -terpineenistä. (Beema Shafreen ja muut 2017.) *S. leucophyllan* tuottaman kamforin, eukalyptolin,  $\beta$ -pinenen,  $\alpha$ -pinenen ja camfeenin todettiin rajoittavan muiden kasvien solujen jakaantumista juurissa (Nishida ja muut 2005). Muun muassa mustikan (*V. corymbosum*) antioksidanttikapasiteetti CUPRAC-testissä oli noin 165  $\mu\text{M}$  TE (Dymerski ja muut 2015).

### 1.1.2 Esterit

Etenkin suoraketjuisia estereitä syntyy rasvahappojen hajoamisen tai vapaiden rasvahappojen synteessin myötä (Hui ja muut 2010). Lipaasit pilkkovat rasvahappoja ja katalysoivat erilaisia esterifikaatioreaktioita. Puolukan sisältämistä yhdisteistä jopa neljäsosa on rasvahappoja, joista oleiini- ja linolihappo olivat runsaimmat. (Klavins ja muut 2021, Yahya, Anderson ja Moo-Young, 1998.) Aminohapot puolestaan toimivat esiasteina 2-metyyli-1-butanolille

ja 3-metyyli-1-butanolille, jotka voivat esteröityä miellyttävän hedelmäisen tuoksuiseksi yhdisteiksi (Hui ja muut 2010).

### 1.1.3 Aldehydit

Haihtuvia aldehydejä muodostuu muun muassa rasvahappojen hapettumisen myötä: linolihapon hapettuminen tuottaa vihreän tuoksuisia (E)-2- tai (E)/(Z)-3-heksenaaleja, jotka puolestaan pelkistyvät alkoholeikseen. (E)-2- tai (E)/(Z)-3-heksenoleista voi taas muodostua miellyttävämmän tuoksuisia heksenyylistereitä. (Vavoura ja muut 2015.) Tyydyttymättömien aldehydien tiedetään syntyvän tyydyttymättömien rasvahappojen hapettumisen seurauksena (Ribeaucourt ja muut 2021).

### 1.1.4 Lipidit haihtuvien yhdisteiden esiasteena

Rasvahapot toimivat esiasteena useille haihtuville yhdisteille. Rasvahappojen hajoaminen tapahtuu pääosin  $\alpha$ - ja  $\beta$ -hapetuksen, lipoksygenaasin (engl. *lipoxygenase*, LOX) katalysoiman aineenvaihdunnan reitin tai auto-oksidaation kautta.  $\beta$ -hapettumisesta poiketen  $\alpha$ -hapettuminen ei kokonaan hajota rasvahappoja, vaan pilkkoo ne lyhyemmiksi ketjuiksi. Nämä vähintään C<sub>12</sub>-pituiset ketjut toimivat esiasteina useille haihtuville yhdisteille, kuten suoraketjuisille alkoholeille, aldehydeille, estereille, ketoneille ja karboksyylihapoille. LOXin katalysoimien reaktioiden myötä linoli- ja linoleenihappo pelkistyvät parin väliasteen kautta lopulta C<sub>6</sub>- ja C<sub>9</sub>-aldehydeiksi. C<sub>6</sub>-aldehydit tunnetaan ”vihreän lehden” yhdisteinä, sillä ne tuoksuvat murskatulta lehdeltä. Muun muassa linolihapon hapettumistuotteita ovat heksanaali ja 2,4-decadienaali, joista ensimmäisellä on rasvaisen vihreä ja ruohoinen tuoksu ja toisella kurkkumainen. Linoleenihapon auto-oksidaatio taas synnyttää runsaasti 2,4-heptadienaalia, jolla on pähkinäinen, rasvainen ja paistettu tuoksu. (Hui ja muut 2010, Luo ja muut 2021.)

## 1.2 Puolukka, *Vaccinium vitis-idaea*

Puolukasta löytyy runsaasti kuitua, kivennäisiä, A-, C- ja E-vitamiinia sekä polyfenoleita. Terveystyötyjen lisäksi puolukka on myös kauniin punainen marja, joka piristää annosta kuin annosta. Esimerkiksi pohjoismaissa, Venäjällä ja Kanadassa puolukka on osa tavallista ruokavaliota. (Mane ja muut 2011.) Puolukka sisältää myös runsaasti värillisiä antosyaniineja, joita voidaan käyttää elintarvikeväreinä. Pakkasen kestäväää puolukkaa kasvaa villinä 24 maassa

lauhkean ilmastovyöhykkeen alueella, jonne myös sen kaupallinen viljely keskittyy. (Pengallegon, 2006.) Tänä päivänä eri puolukka lajikkeita on yli 20, mutta niiltä puuttuu kaupallisen viljelyn kannalta oleellisia ominaisuuksia. Esimerkiksi fenolisten yhdisteiden kokonaispitoisuus oli korkeampi puolukan lehdissä kuin marjoissa. (Vilkickyte ja muut, 2022.)

Puolukka ei kuitenkaan happaman ja hieman kitkerän makunsa takia ole yhtä suosittu marja kuin mustikka tai mansikka. Puolukan viljely on muihin *Ericaceae*-perheen marjoihin verrattuna vähäistä ja se täytyykin poimia metsästä, mikä tekee hankinnasta vaativampaa. Happamuuden ja hankinnan vaativuuden takia puolukka ei ole saavuttanut samanlaista suosiota kuin muut viljeltävät marjat. Puolukan sisältämän bentsoehapon lisäksi se sisältää melkein kaksin verroin sitruunahappoa mustikkaan ja mansikkaan verrattuna. Vaikka puolukka sisältää myös runsaasti sokereita, ne eivät yksinään riitä peittämään happamuutta. (Viljakainen ja muut 2010; Viljanen ja muut 2014; Kowalska, 2021.) Ei ole siis ihme, että puolukka sijoittui viimeiseksi marjojen miellyttävyyttä testanneessa aistinvaraisessa tutkimuksessa (Laaksonen ja muut 2016). Happamuuden osoitettiin vaikuttavan negatiivisesti jopa mustikan maun miellyttävyyteen (Gilbert ja muut 2015). Suomessa puolukkaa kerätään kuitenkin kaksin verroin enemmän kuin mustikkaa. Siitä huolimatta mustikka- ja puolukkasadosta jää metsiin lähes 90 %. (Turtiainen, Salo ja Saastamoinen, 2011.)

### 1.2.1 Puolukan yhdisteiden bioaktiivisuus

Kehon kroonisen tulehdustilan tiedetään vaikuttavan monien sairauksien, kuten diabeteksen, sydän- ja verisuonisairauksien, syövän ja ateroskleroosin syntyyn (Alfaddagh ja muut 2020). Puolukasta saattaa olla apua kehon tulehdustilan hoitoon, sillä puolukka sisältää runsaasti bioaktiivisia yhdisteitä, jotka lieventävät tulehdustilaa (Popescu ja muut 2021). Puolukan lisäämisestä ruokavalioon saattaa olla hyötyä muun muassa veren seerumin kolesterolin alentamisessa, virtsatieinfektion ehkäisemisessä ja jopa tiettyjen syöpien hillitsemisessä (Zhang ja muut 2019; Davidson ja muut 2014; McDougall ja muut 2008).

Tuore puolukka sisältää noin 600 mg/100 g fenolisia yhdisteitä joista 40–94 mg/100 g on antosyaniineja. Antosyaniinit antavat puolukan marjalle sen punaisen värin ja niiden määrään vaikuttaa oletettavasti kasvuolosuhteet. (Bujor ja muut 2018.) Esimerkiksi Yhdysvalloissa Oregonissa kasvatetuissa puolukoissa oli lähes kaksin verroin enemmän fenolisia yhdisteitä, kuin Kanadan puolella

Labradorissa kasvatetuissa. Tutkimuksissa on myös huomattu, että viljelty puolukka sisältää hieman vähemmän antosyaniineja kuin villi lajike. (Kowalska, 2021.)

Biosaatavuudella tarkoitetaan tietyn bioaktiivisen yhdisteen kykyä vaikuttaa soluihin tai elimiin terveydelle edullisella tavalla. Yhdisteiden täytyy kuitenkin säilyttää bioaktiivisuutensa kulkiessa ruoansulatuskanavan läpi. Puolukan bioaktiivisten yhdisteiden, kuten flavonolien, on osoitettu säilyttävän aktiivisuutensa huolimatta niiden läpikäymistä muutoksista suolistossa. (Brown ja muut 2014.)

### 1.2.2 Puolukan (*Vaccinium vitis-idaea*) haihtuvat yhdisteet

Puolukan (*Vaccinium vitis-idaea*) ja muiden samaan sukuun kuuluvien kanervakasvien haihtuvista yhdisteistä on tehty suhteellisen vähän tutkimusta. Puolukan haihtuvia yhdisteitä tutki ensimmäistä kertaa Anjou ja muut vuonna 1967. Tuolloin tutkimusryhmä löysi pektinaasilla käsitellystä puolukkamehusta 80 eri yhdistettä, joista 2-metyyliibutaanihappo eli 2-metyylivoihappo oletettiin tärkeimmäksi puolukan haihtuvaksi yhdisteeksi korkean konsentraation ja vahvan tuoksun takia. Ryhmä arveli puolukan sisältävän löytyneiden yhdisteiden lisäksi satoja muita pienissä määrin esiintyviä haihtuvia yhdisteitä. Anjou ja muut (1967) huomasivat myös aromaattisten yhdisteiden kuten bentsoehapon vastaavan hieman yli puolesta (52,3 %) haihtuvista yhdisteistä. Vaikka makean kukkaiselta tuoksuvaa bentsyylialkoholia on 40 % kaikista puolukan aromaattisista yhdisteistä, he eivät kuitenkaan olettaneet sen vaikuttavan puolukan ominaisuuteen merkittävästi, sillä sen OAV-arvo on suhteellisen pieni. Muut aromaattiset yhdisteet, kuten bentsaldehydi, vaikuttavat korkeamman OAV:n takia vahvemmin puolukan tuoksuun pienestä konsentraatiosta huolimatta. Tutkimuksessa löydettyillä 13 alifaattisella alkoholilla on myös vahva ominaisuus ja niitä esiintyy suhteellisen korkeissa konsentraatioissa. Tyydyttymättömien rasvahappojen hapettumisen tiedetään synnyttävän ei-toivottuja hapettumistuotteita, joiden hajoamistuotteina ovat muun muassa aldehydit. Osalla aldehydeistä on epämiellyttävä tuoksu ja huonontavat siten tuoksuprofiilia. (Mazurek ja muut 2022.)

Pari vuotta myöhemmin Anjou ja Sydow (1969) löysivät 82 haihtuvaa yhdistettä puolukan puristusjätteestä. Nämä yhdisteet vastaavat 90 % puolukan haihtuvien yhdisteiden kokonaismäärästä. Tutkijat onnistuivat tunnistamaan 44 yhdistettä.

He myös osoittivat puolukkamehun sisältävän kuusinkertaisen määrän haihtuvia yhdisteitä puristusjätteeseen verrattuna ja epäilivät tämän johtuvan mehussa olevista helpommin haihtuvista yhdisteistä. Voimakkaimmin tuoksuun vaikuttavaksi yhdisteiksi he päättelivät 2-metyyli-3-buten-2-olin, linaloolin, 4-terpinenolin,  $\alpha$ -terpineolin, useiden aromaattisten yhdisteiden ja 2-metyylibutaanihapon ohella. Edellä mainitut yhdisteet kattavat suurimman osan puolukan haihtuvista yhdisteistä, mutta 2-metyylibutaanihapon konsentraation todettiin olevan puolet haihtuvien yhdisteiden kokonaismäärästä.

Viljanen ja muut (2014) tutkivat entsyymi- ja mikrobikäsittelyn vaikutusta puolukan kemiallisiin yhdisteisiin ja aistinvaraisiin ominaisuuksiin Tutkimuksessa he tunnistivat yhteensä 38 haihtuvaa yhdistettä. Lukumäärältään suurin yhdisteluokka oli aldehydit ja niiden jälkeen alkoholit, terpeenit, ketonit, esterit ja hapot. 2-metyylibutaanihappo osoittautui myös Viljasen tutkimuksessa puolukassa runsaasti esiintyväksi yhdisteeksi etanolin, metyylibentsoaatin, etyyliasetaatin, diasetyylin ja 3-metyylibutaanihapon ohella. He myös yhdistivät aistinvaraisessa arvioinnissa muutamat haihtuvat yhdisteet tiettyihin makuihin: raikas ja puolukkamainen maku yhdistettiin oktanaaliin ja nonanaaliin ja makea, eltaantunut sekä hapan 3-metyylibutaanihappoon.

### 1.3 Muiden *Vaccinium*-marjojen ja mustaherukan haihtuvat yhdisteet

*Vaccinium*-sukuun kuuluu satoja eri lajeja, joista mustikat, karpalot ja puolukat ovat kaupallisesti tärkeitä marjoja niin Suomessa kuin maailmalla (Sater ja muut 2020; Turtiainen, Salo ja Saastamoinen, 2011). Karpalon ja mustikan haihtuvia yhdisteitä on tutkittu huomattavasti enemmän kuin puolukan. Tiedetyt haihtuvat yhdisteet vaikuttavat marjan makuun nenän hajureseptorien kautta, mutta näiden yhdisteiden tutkimus on vasta aluillaan. Puolukan haihtuvia yhdisteitä on kartoitettu vain muutamissa tutkimuksissa. (Sater ja muut 2020.)

#### 1.3.1 Kangasmustikka, *Vaccinium myrtillus* L. ja muut mustikat

Yli tusinasta eri mustikkalajeja *Vaccinium myrtillus* on juuri Suomen metsissä kasvava heinäkuussa marjova varpu. *V. myrtillus* eroaa muista yleisistä mustikkalajeista siten, että sen marjat ovat väriltään tumman sinisiä ja sisältä punertavia. Pensasmustikka eli *V. corymbosum* on kangasmustikkaan verrattuna vaaleamman sinisempi ja sen hedelmäliha on vihertävää. *V. angustifolium* eli kanadanmustikka ja *V. virgatum* muistuttavat molemmat edellä mainittua



pensasmustikkaa ja luonnonvaraisia Pohjois-Amerikassa. Ne eroavat väriltään, maultaan ja tuoksultaan toisistaan. Pensasmustikka kattaa Yhdysvaltain mustikkamarkkinoista jopa 95 %. (Du ja Rouseff, 2014.) Alkoholit ja esterit ovat hallitsevia haihtuvia yhdisteitä mustikassa. Muihin pienmarjaisiin hedelmiin verrattuna mustikka sisältää vähemmän haihtuvia yhdisteitä ja on myös siksi heikommin tuoksuva. (Hui ja muut 2010.)

*V. corymbosumissa* merkittävimmät haihtuvat yhdisteet ovat etyyliasetaatti, (E)-2-heksenaali, (E)-2-heksenoli, heksanaali, (Z)-3-heksenoli, linalooli ja geranioli (Hirvi ja Honkanen, 1983). Horvat ja Senter (1985) puolestaan huomasivat terpeenien, kuusihillisten tyydyttymättömien aldehydien ja tyydyttymättömien alkoholien olevan merkittävimpiä yhdisteitä *V. virgatumissa*. Aistinvaraisessa arvioinnissa he päätyivät linalooliin, 2-heksenaalin, 2-hexenolin, 3-heksen-1-olin ja geraniolin muodostavan tuoreen mustikan tuoksun. Marjan kypsyminen puolestaan kasvatti linaloolin konsentraatiota ja vähensi  $\alpha$ -terpineolin ja  $\beta$ -karyofylleenin konsentraatioita (Horvat ja muut 2011). *V. angustifolium* ja *V. myrtillus* L. tuottavat enemmän hedelmäisen tuoksuisia estereitä kuin *V. corymbosum* ja *V. virgatum*, joista puolestaan löytyi runsaammin vihreän tuoksuisia aldehydejä (Farneti ja muut 2017).

Runsaimmiksi haihtuviksi yhdisteiksi *V. corymbosumissa* osoittautui linalooli, (E)-2-heksenaali, (E)- ja (Z)-dehydrolinaloolioksidi, limoneeni, heksanaali,  $\alpha$ -terpineoli ja geranioli. Yhteensä Dun ja muiden (2012) tutkimuksessa tunnistettiin 32 yhdistettä. Vuonna 2022 tehdyssä tutkimuksessa tunnistettiin 73 haihtuvaa yhdistettä *V. corymbosumin* kuudesta eri lajikkeesta. Marjat lajiteltiin koon, värin ja kuoren epäkohtien mukaan ja runsaimmin esiintyviksi yhdisteiksi todettiin heksanaali, limoneeni, (E)-2-heksenaali, linalooli,  $\alpha$ -terpineoli ja geranioli. Runsaimmin mustikoista löytyi aldehydejä, mutta terpeenit osoittautuivat monipuolisimmaksi yhdisteluokaksi. Kokonaishaihtuvien määrässä lajikkeiden välillä oli lähes kymmenkertainen ero: Draper-lajikkeessa kokonaishaihtuvien määrä oli 48,28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ja Last Call —lajikkeessa vain 4,50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . (Pico, Gerbrandt ja Castellarin, 2022.) (E)-2-heksenaali osoittautui hallitsevaksi yhdisteeksi *V. corymbosumissa* Eichholzin ja muiden (2011) tekemässä tutkimuksessa. Lisäksi mustikoista löytyi runsaasti heksanaalia, (Z)-3-heksenaalia, eukalyptolia, metyyliisoheksenyliketonia, (Z)-3-heksenolia, (E)-2-heksenolia, 1-heksanolia ja linaloolia.

Du ja Rouseff (2014) vertasivat neljän eri *V. ashein* (*V. virgatumin* lajike) lajikkeiden haihtuvia yhdisteitä. Suurin haihtuvien yhdisteiden luokka oli aldehydit ja näiden jälkeen esterit ja terpeenit. Yhdisteistä terpeenien määrä vaihteli eniten lajikkeiden välillä. Lajikkeiden välillä oli myös huomattavia eroja haihtuvien yhdisteiden intensiteetissä. Mustikan tuoksuun vaikutti merkittävimmin aldehydit ja terpeenit.

Haihtuvien yhdisteiden huomattiin vaikuttavan koettuun makeuteen ja happamuuteen Gilbertin ja muiden (2015) tekemässä tutkimuksessa mustikan haihtuvista yhdisteistä ja aistinvaraisista ominaisuuksista.  $\beta$ -karyofylleenioksidin ja 2-heptanonin todettiin lisäävän panelistien kokemaa maun miellyttävyyttä ja makeutta. Yllättävästi linalooli ja eukalyptoli vaikuttivat negatiivisesti mustikan yleiseen miellyttävyyteen. Erityisesti eukalyptoli lisäsi koettua happamuutta ja sitä esiintyi runsaimmin alkuvuodesta kerätyissä marjoissa. Myös vihreänä aldehydinä tunnettu (E)-2-heksenaali lisäsi aistittua happamuutta ja vähensi miellyttävyyttä ja makeutta. (E)-2-heksenaali oli runsain haihtuva yhdiste kaikissa näytteissä ja erityisen korkea alkuvuoden marjoissa. 3-metyyli-1-butanoli puolestaan tehosti mustikan ominaismakua ja paransi maun voimakkuutta. Tiettyjen yhdisteiden lisääminen ja toisten vähentäminen jalostuksen kautta edistäisi mustikan miellyttävyyttä markkinoilla vastaamalla kuluttajien vaativiin makutottumuksiin.

Gilbertin tutkimusryhmä tutki myös kasvupaikan ja lajikkeen genotyypin vaikutusta haihtuviin yhdisteisiin. Genotyyppi vaikutti merkittävästi kaikkiin muihin haihtuviin yhdisteisiin paitsi heksaanihappoon. Kasvupaikka puolestaan vaikutti merkittävästi vain linaloolin ja metyyliheksanoatin esiintyvyyteen. 6-metyyli-5-hepten-2-olin konsentraatio vaihteli runsaimmin eri lajikkeiden välillä, mutta myös linaloolin ja eukalyptolin määrässä oli huomattavia eroja genotyyppien kesken. Etelämmässä kasvaneissa marjoissa oli pohjoisempiin verrattuna enemmän  $\beta$ -karyofylleenioksidia.

### 1.3.2 Karpalo, *Vaccinium macrocarpon* ja *oxycoccos* L.

Ensimmäiset tutkimukset liittyen karpalon haihtuviin yhdisteisiin tehtiin jo 60-luvulla. Croteau ja Fagerson (1968) tunnistivat yhteensä 42 yhdistettä karpalomehusta. Edellä mainittu tutkimus oletti tunnistettujen yhdisteiden kattavan jopa 95 % kaikista karpalon haihtuvista yhdisteistä ja, että loput 5 % sisältää yli 200 muuta haihtuvaa yhdistettä. Pienistä määristään huolimatta nämä

yhdisteet saattavat olla tärkeitä karpalon ominaistuuksissa bentsaldehydin, bentsyyliesterin, bentsoaattien ja terpeenien ohella. Tuolloin bentsoehappo oli runsain haihtuva yhdiste ja noin vuosikymmen myöhemmin tutkijat onnistuivat tunnistamaan 70 yhdistettä, joista yli puolta ei ollut aiemmin löydetty karpalossa. Karpalon tuoksuun keskeisesti vaikuttaviksi yhdisteiksi he ilmoittivat  $\alpha$ -terpineolin ja useat aromaattiset yhdisteet. Tutkimuksessa huomattiin myös eurooppalaisten karpaloiden (*Vaccinium oxycoccos*) sisältävän peräti viisinkertaisen määrän haihtuvia yhdisteitä kuin Pohjois-Amerikkalaisen (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). (Hirvi, Honkanen ja Pyysalo, 1981).

Rusen ja muiden (2012) mukaan karpalon sisältävän runsaimmin 4-penten-2-olia, heksanaalia, bentsaldehydiä,  $\alpha$ -terpineolia ja bentsyylialkoholia. Kukkaiselta ja syreeniltä tuoksuvan  $\alpha$ -terpineolin tiedetään olevan tärkeä yhdiste karpalon ominaisen tuoksun muodostuksessa (Anjou ja muut 1967). Villin karpalon kukkainen tuoksu oli kuitenkin hillitympi kuin viljeltyjen lajikkeiden Rusen ja muiden (2012) tutkimuksessa. He päättelivät tämän johtuvan eroista monoterpeenien kuten  $\alpha$ -terpineolin muodostumisissa viljellyissä ja villeissä karpaloissa. Lisäksi villissä karpalossa oli huomattavasti vähemmän heksanaalia kuin viljellyissä ilmeni heidän tutkimuksessaan.

Karpalon tuoksuprofiilia tutkineet Zhu ja muut (2016) totesivat kuusihiilisten vihreältä tuoksuvien yhdisteiden, kukkaisen linaloolin ja  $\beta$ -iononin, 2-metyyliburyyrihapon ja bentsoehapon vaikuttavat olennaisesti karpalon tuoksuun. He löysivät neljästä eri karpalolajikkeesta 33-36 eri haihtuvaa yhdistettä, joista yli kolmasosa vaikuttaa karpalon tuoksuprofiiliin (OAV > 1). Merkittävimmin tuoksuun vaikutti heksanaali (OAV 27-60), pentanaali (OAV 31-51), (E)-2-heksenaali (OAV 18-63), (E)-2-heptenaali (OAV 17-66) ja (E)-2-nonenaali (OAV 8-77).  $\alpha$ -terpineolia ja aromaattisia yhdisteitä esiintyi korkeissa konsentraatioissa kaikissa lajikkeissa, mutta niiden OAV:t jäivät alhaisiksi.  $\alpha$ -terpineolin konsentraatio oli 48,26-98.39  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ja OAV 2-4 ja bentsaldehydin konsentraatio 1174,48-5633,34  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ja OAV 4-18. Näiden yhdisteiden OAV-havaitsemiskynnykset ovat 28 ja 320  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Heksanaalin OAV-arvo oli keskimäärin korkein, vaikka sen konsentraatio oli vain noin neljäsosa bentsaldehydistä. (E)-2-nonenaalilla oli myös erityisen korkeat OAV-arvot (8, 65, 18 ja 77) huolimatta sen pienistä konsentraatioista (3,00, 25.99, 7,07 ja 30,66  $\mu\text{g}$

/kg). Yhdisteen aistinvaraiseen havainnointiin vaikuttaa siis moni muu asia kuin sen volyyymi.

### 1.3.3 Mustaherukka, *Ribes nigrum*.

Liu ja muut (2018) löysivät 166 vapaata haihtuvaa yhdistettä yhteensä kuudesta eri mustaherukkalajikkeesta, joista esterit ja terpeenit määriteltiin merkittävimmiksi haihtuviksi yhdisteiksi. Etenkin esterien määrässä oli merkitsevästi eroa lajikkeiden kesken: eri estereitä tunnistettiin yhteensä 31, mutta vain kahdeksaa esteriä löytyi jokaisesta lajikkeesta. Kymmenisen vuotta aikaisemmin tehdyssä tutkimuksessa huomattiin myös merkittäviä eroja esterien ja monoterpeenien määrässä 13 eri lajikkeen välillä. Tutkimuksessa tunnistettiin yhteensä 45 haihtuvaa yhdistettä, joista esterit ja monoterpeenit olivat suurimmat yhdisteryhmät. Estereistä etenkin metyylibutanoaatti, etyylibutanoaatti, etyyliheksanoaatti ja metyyliasetaatti antavat mustaherukalle hedelmäisen ja kukkaisen tuoksun kun taas terpeenien eukalyptolin ja  $\beta$ -damaskonen tiedetään vastaavan tyypillisestä mustaherukan tuoksusta. (Christensen ja Pedersen, 2006.) Christensenin ja Pedersenin tulokset myös osoittivat, että mustaherukan tuoksuprofiilin parantaminen vaatii kasvuolosuhteiden muuttamisen sijaan keskittymistä kasvin perimään ja genetiikkaan.

Marsol-Vall ja muut (2018) osoittivat pohjoisemmalla leveyspiirillä kasvaneiden mustaherukoiden sisältävän runsaammin haihtuvia yhdisteitä kuin etelämmässä kasvaneet. He huomasivat myös lämpötilan ja auringon säteilyn vaikuttavan haihtuvien yhdisteiden määrään: alhainen lämpötila ja säteily kuukauden sisällä marjojen keräämisestä näytti korreloivan positiivisesti haihtuvien yhdisteiden määrän kanssa. Kahdeksan vuotta kestäneen tutkimuksen aikana kerättiin kolmen eri mustaherukkalajikkeen (Ola, Mortti ja Melalahti) marjoja Piikkiöstä ja Apukasta. Haihtuvia yhdisteitä löydettiin ja tunnistettiin 41 kappaletta, joista terpeenejä oli yhteensä 34 yhdistettä. Terpeenien lisäksi tutkijat tunnistivat neljä esteriä, kaksi aldehydiä ja yhden alkaanin. Runsaimmin esiintyvä yhdiste oli limoneeni ja  $\delta$ -3-kareeni seuraaviksi runsain Olassa ja Mortissa, mutta  $\gamma$ -terpineeni puolestaan Melalahdessa. Pohjois- ja Etelä-Suomessa kasvaneiden marjojen haihtuvissa yhdisteissä oli kvalitatiivisten erojen sijaan merkittävä ero yhdisteiden määrässä. Kasvuolosuhteet vaikuttavat luultavasti voimakkaammin yhdisteiden määriin kuin genotyyppi.

Vastaavasti kahden edellä mainitun tutkimuksen mukaan, myös Jung ja muut (2017) raportoivat esterien ja terpeenien olevan suurimmat yhdisteryhmät mustaherukassa. He tunnistivat yhteensä 155 haihtuvaa yhdistettä kaupallisista ja kahdesta eri paikasta Saksassa poimituista mustaherukoista. Aikaisemmista tutkimuksista poiketen heidän tutkimistaan marjoista löytyi runsaasti kuusihillisiä yhdisteitä, erityisesti (E)-2-heksenaalia ja (Z)-3-heksenaalia. Aikaisemmissa mustaherukatutkimuksissa on tutkittu ainoastaan pakastettuja marjoja, joten tutkijat epäilivät pakastuksen vaikuttavan haihtuvien yhdisteiden muodostumiseen. 9 kuukauden säilytys -20 °C johti heidän tutkimuksessaan kuusihillisten aldehydien ja alkoholien merkittävästi alhaisempaan konsentraatioon. Pakastuksen aikana myös marjojen esterien määrä väheni. (Z)-3-heksen-1-olin konsentraatioon pakastuksella taas ei ollut vaikutusta. Samalla linoli- ja oleiinihapon hapettumisen myötä syntyvien heksanaalin, heptanaalin, (E)-2-heptanaalin, (E)-2-oktenaalin, dekanaalin ja nonanaalin määrä kasvoi pakastuksen aikana. Pakastettujen marjojen tuoksuprofiilia hallitsevat siten terpeenit.

Vuonna 2016 tehty tutkimus osoitti rikkiä sisältävän 4-metoksi-2-metyyli-2-butanetiolin olevan merkittävä yhdiste mustaherukan ominaistuoksussa (Jung, Fastowski ja Engel, 2016). Korkeimman OA-arvon (475) Jungin ja muiden (2017) tutkimuksessa sai vihreän tuoksuinen (Z)-3-heksenaali ja toiseksi korkeimpana (350 OAV) oli 4-metoksi-2-metyyli-2-butanetioli. Tuore tutkimus vuodelta 2020 keräsi 25:stä mustaherukan haihtuviin yhdisteisiin liittyvästä tutkimuksesta ja niistä vain yksi ilmoitti 4-metoksi-2-metyyli-2-butanetiolin tärkeäksi tuoksuiseksi yhdisteeksi. Yhteensä 351 haihtuvaa yhdistettä on tunnistettu mustaherukasta ja niistä hieman yli 20 vaikuttaa (Pagès-Hélary, Dujourdy ja Cayot, 2022).

## 1.4 Kasvuolosuhteiden vaikutus haihtuviin yhdisteisiin

### 1.4.1 Puolukka, *Vaccinium vitis-idaea*

Ensimmäisen kerran puolukkaa viljeltiin Ruotsissa ja Suomessa 60-luvulla (Hjalmarsson ja Ortiz, 2008). Bujour ja muut (2018) raportoivat vuodenaikojen vaikuttavan marjan fenolisten yhdisteiden määrään vain rajoitetusti, ja että eroihin vaikuttaa luultavammin kasvin kokema stressi. Ympäristön aiheuttama abioottinen stressi ja muiden eliöiden aiheuttama bioottinen stressi saattaa siis vaikuttaa marjan sisältämään fenolisten yhdisteiden määrään (Bujor ja muut 2018).

#### 1.4.2 Kangasmustikka, *Vaccinium myrtillus* L ja muut mustikat

Uleberg ja muut (2012) tutkivat lämpötilan ja valon määrän vaikutusta satoon ja kemiallisten yhdisteiden määrään mustikassa. Heidän tutkimuksessaan Pohjois- ja Etelä-Suomesta kerättyjä mustikoita kasvatettiin kontrolloidussa ympäristössä, eli fytotronissa, 12 ja 18 asteessa joko 12 tai 24 tunnin ajan luonnonvalolla tai 24 tunnin ajan luonnonvalolla ja punaisella valolla.

Mustikat tuottivat marjoja yhtä paljon molemmissa lämpötiloissa ensimmäisenä vuonna, mutta seuraavana kaksin verroin enemmän 18 °C lämmössä kuin 12 °C. Ero saattaa johtua pölyttäjien määrästä. Etelän mustikat tuottivat ensimmäisenä vuonna hieman enemmän marjoja 12 °C kuin pohjoisen ja toisena vuonna pohjoisen mustikat tuottivat taas runsaimman sadon molemmissa lämpötiloissa. Tutkimusryhmä kertoo myös pohjoisen marjojen sisältävän huomattavasti enemmän fenoleita ja antosyaniineja, mikä vastaa aikaisempia tutkimustuloksia ja viittaa erilaiseen genotyyppiin eri leveysasteilla. Punaisen valon määrä vaikutti positiivisesti pohjoisen mustikan antosyaniinien määrään, kun taas etelän mustikka tuotti runsaimmin antosyaniineja 24 tunnin luonnonvalossa. Lämpötila vaikutti olennaisesti myös tuotetun omenahapon määrään: omenahappoa oli eniten 18 °C ja kiinihappoa 12 °C. Pohjoisen ja etelän mustikoiden hapoissa oli myös eroja, sillä omenahappoa oli runsaimmin pohjoisen ja kiinihappoa etelän genotyypissä. Sokerien määrän oli huomattavasti korkeampi 12 asteessa kasvaneissa mustikoissa.

*V. corymbosum*issa todettiin lämpötilan ja keräysajankohdan vaikuttavan haihtuvien yhdisteiden määriin. Kolmen viikon sisällä tutkijat keräsivät neljänä eri ajankohtana marjoja, ja huomasivat muun muassa 2-etyyliheksanolin ja linaloolin määrien vaihtelevan merkitsevästi. Du ja muut (2012) päättelivät vaihtelun johtuvan lämpötilaeroista kolmen viikon aikana: toukokuun aikana lämpötila oli 18 ja 33 asteen välillä. Marjat oli kerätty eri ajankohtina, mutta saman kypsyisinä. (Du, Olmstead ja Rouseff, 2012.)

UVB-valon huomattiin lisäävän eukalyptolin ja linaloolin määriä *V. corymbosum*issa. Tutkijat käyttivät kahta eri valonvoimakkuutta ja altistumisaikaa: kaksi tai 24 tuntia joko heikossa (0,075 Wh/m<sup>2</sup>) tai voimakkaassa (0,15 Wh/m<sup>2</sup>) UVB-valossa. Kahden tunnin valaisu UVB-valoa kasvatti eukalyptolin ja linaloolin määriä, kun taas 24 tunnin valaisulla ei ollut yhtä merkitseviä vaikutuksia. Erityisesti linaloolin määrä väheni huomattavasti 24

tuntia kestävän UVB-valaisun myötä. Kahden tunnin valaisulla oli myös lievä positiivinen vaikutus metyyli-isoheksenyliketonin määrään. (Eichholz ja muut 2011.) Kasvien tiedetään tuottavan sekundaarisia metaboliitteja ulkoisen stressin kuten auringon säteilyn takia. Tällöin muun muassa terpeenien synteesi kiihtyy. (Pateraki ja Kanellis, 2010.) Ketonien lisääntyvään synteesiin puolestaan vaikuttaa UVB-säteilyn aiheuttama voimistava säätely (engl. *up-regulation*) synteesiä katalysoimassa fosfolipaasientsyymissä (Lo ja muut 2004). Valoaltistus vaikutti myös kuusihilisiin aldehydeihin: (E)-2-heksenaalin määrä lisääntyi muissa olosuhteissa kuin 24 tunnin valaisussa alhaisella voimakkuudella. Myös (Z)-3-heksenaalia löytyi merkitsevästi enemmän kahden tunnin ajan valaistuista marjoista. (Eichholz ja muut 2011.) Tämän kasvun selittää myös kasvin reagointi ulkoiseen stressiin, eli säteilyyn. Säteilyn tuottama stressireaktio kasvissa hapettaa solukalvon linoleeni- ja linolihappoja, joista lipoksygenaasin katalysoimana syntyy C<sub>6</sub>-aldehydejä. (Wang, Peng ja Proctor, 1990.)

#### 1.4.3 Mustaherukka, *Ribes nigrum*

Pagès-Hélary ja muiden (2020) tutkimuksessa huomattiin mustaherukan sisältävän aluespesifisiä haihtuvia yhdisteitä. Heidän multivariaattianalyysinsä 25 eri mustaherukatutkimuksesta raportoi saksalaisissa marjoissa 7 ominaisyhdistettä ja 10 isobritannialaisissa. Tanskalaisissa ja suomalaisissa marjoista löydettiin kummastakin yksi ominaisyhdiste.

### 1.5 Kypsyysasteen vaikutus haihtuviin yhdisteisiin marjoissa

Kypsyminen saa aikaan monenlaisia muutoksia hedelmissä: väri, fyysinen ja kemiallinen koostumus ja aistinvaraiset ominaisuudet muuttuvat ja hedelmästä tulee syötävä. Hedelmien ominainen maku kehittyy kypsymisen myöhemmissä vaiheissa, jolloin hiilihydraateista, rasvoista ja proteiineista muodostuu haihtuvia yhdisteitä. Hedelmän kerääminen keskeyttää kypsymisen ja lopettaa sokerien ja veden siirtämisen kasvista hedelmään. Samalla kuitenkin aineenvaihdunta ja soluhengitys jatkuu, minkä takia kypsyminen etenee keräyksestä huolimatta. (Brückner ja Wyllie, 2008; Pérez ja muut 2002.) Aldehydien määrä on tyypillisesti korkeampi raaissa hedelmissä, mutta vähenee kypsymisen edetessä. Puolestaan esterit ja ominaistuoksuun vaikuttavat yhdisteet ovat merkittävässä osassa kypsässä hedelmässä. (Brückner ja Wyllie, 2008.)

### 1.5.1 Mustaherukka, *Ribes nigrum*

Marjan kypsyminen vaikutti erityisesti esterien määrään mustaherukassa: Titania-lajikkeesta ei pystytty tunnistamaan yhtään aikaisemmin tunnistettua esterää, mutta Rosenthals-lajikkeessa puolestaan etyyli-butanaatin ja metyyli-heksanaatin pitoisuudet olivat merkittävästi nousseet. Monoterpeenien terpinen-4-olin, sabinene hydraatin,  $\beta$ -linaloolin ja sitronellonin konsentraatiot laskivat kypsymisen myötä. Lisäksi (Z)-3-heksenaalin ja (Z)-3-heksen-1-olin pitoisuus laski marjan kypsyessä, mikä vastaavasti johti muiden kuusihiilisten yhdisteiden alhaisempaan pitoisuuteen. (Jung ja muut 2017.)

### 1.5.2 Mustikka, *Vaccinium myrtillus*

Hall ja muut (1970) tutkivat jo 70-luvulla kypsyysasteen vaikutusta *Vaccinium angustifolium*issa. Tuolloin he huomasivat asetaldehydin, etyyliasetaatin ja etyylialkoholin olevan hallitsevia yhdisteitä vihreän raaoissa mustikoissa. Lisäksi tutkimuksessa todettiin haihtuvien yhdisteiden lisääntyvän ajan kuluessa: edellä mainittujen yhdisteiden konsentraatio nousi merkittävästi kolmen ja 25 tunnin aikana keräyksestä. Beaulieu ja muut (2014) totesivat esterit ja aldehydit runsaimmiksi yhdisteryhmiksi kypsässä *Vaccinium asheissa*. Viittä eri *V. ashein* lajiketta neljällä eri kypsyysasteella tutkineet Beaulieu ja muut (2014) huomasivat kypsien ja ylikypsien marjojen sisältävän runsaasti estereitä, kun taas raaoissa marjoissa ei ollut lainkaan estereitä. Kypsyysaste vaikutti voimakkaimmin terpeenien, estereiden, alkoholien ja aromaattisten yhdisteiden määriin. Näiden yhdisteiden konsentraatio kasvoi vihreästä marjasta kypsään marjaan asti, mutta aleni marjan ylikypsyessä. Marjan kypsyys kasvatti edellä mainittujen yhdisteluokkien määriä ja erityisesti  $\beta$ -myrseeniä ja linalooliyhdisteitä löytyi runsaasti kypsemmistä marjoista. Myös muiden mustikan tuoksuun olennaisesti vaikuttavien yhdisteiden, kuten metyyli-3-metyylibutyraatin, eukalyptolin, (Z)-3-heksenalin ja heksyyliasetaatin määrät kasvoivat merkittävästi marjan kypsyessä. (Beaulieu, Stein-Chisholm ja Boykin, 2014.)

Farnetti ja muut (2017) puolestaan tutkivat mustikan neljän eri kypsyysasteen vaikutusta haihtuviin yhdisteisiin. He huomasivat, että ylikypsät marjat sisältävät vähemmän sitruksen tuoksuisia monoterpeenejä kuin kypsät ja raaoissa marjoissa oli runsaammin vihreältä tuoksuvia aldehydejä ja estereitä. He tunnistivat yhteensä 106 haihtuvaa yhdistettä ja päätyivät haihtuvien yhdisteiden jakautuvan kolmeen luokkaan: (1) yhdisteet, joita esiintyy kaikissa lajikkeissa ja



kypsyysasteissa, mutta pienin määrin, (2) yhdisteet, joita syntyy raaissa marjoissa ja joiden määrä vähenee marjan kypsyessä sekä (3) yhdisteet, joita esiintyy vain kypsissä ja ylikypsissä marjoissa. Kolmannen vaiheen yhdisteiden, monoterpeenien, (Z)-2-heksen-1-olin ja heksanaalin, oletetaan luovan tyypillisen mustikkamaisen tuoksun.

Tietyt haihtuvat yhdisteet, kuten heksanaali, metyyli-3-metyylibutanaatti, (E)-2-heksenaali, (Z)-dehydrolinaloolioksidi, linalooli ja geranioli erottavat kypsän mustikan raa'asta todetaan Dun ja muiden (2012) tekemässä tutkimuksessa. Näiden yhdisteiden konsentraatio oli merkitsevästi suurempi kypsässä kuin kahdessa muussa raaemman asteen marjassa. Tuloksista huomattiin myös mustikkalajikkeiden Primadonna ja Jewel välinen ero: Primadonna tuotti kypsyessään enemmän haihtuvia yhdisteitä kuin Jewel. (Du, Olmstead ja Rouseff 2012.) Terpeenien määrässä oli suurimpia eroja juuri lajikkeiden välillä. Kypsyysaste vaikutti terpeenien ohella esterien, aromaattisten yhdisteiden ja alkoholien määrään. (Beaulieu, Stein-Chisholm ja Boykin 2014.)

### 1.5.3 Mansikat, *Fragaria*

Kolmen mansikkalajikkeen haihtuvia yhdisteitä tutkivat Azodanlou ja muut (2004) huomasivat kypsymisen vaikuttavan haihtuvien yhdisteiden laatuun ja määrään. He mittasivat haihtuvia yhdisteitä raaista marjoista, jotka olivat vihreitä, valkoisia tai puoliksi punaisia. Kypsät marjat olivat luokiteltu  $\frac{3}{4}$  punaisiksi, punaisiksi ja tumman punaisiksi.

Azodanlou ja muut ehdottavat, että mansikan kypsyysaste voidaan päätellä selvittämällä tiettyjen haihtuvien yhdisteiden määrä. Erityisesti 2-metyylibutaanihappo, 2-metyylibutyylibutanaatti ja etyyli-2-metyylibutanaatti osoittautuivat kypsyttä merkitseviksi yhdisteiksi tutkituissa lajikkeissa. Heksanaali oli hallitseva yhdiste jokaisen lajikkeen vihreissä marjoissa. Kypsymisen edetessä haihtuvien yhdisteiden kokonaismäärä nousi, mutta vihreiden aldehydien (heksanaali, (E)-2-heksenoli ja (Z)-3-heksenyliasettaatti) määrä puolestaan laski. Esterien määrä nousi huomattavasti marjan kypsyessä  $\frac{3}{4}$  punaisesta tumman punaiseksi. Mansikan ominaistuoksuun merkitsevästi vaikuttavan yhdisteen furaneolin konsentraatio vaihteli kypsymisen aikana. Tämä saattaa johtua furaneolin epästabiilista luonteesta (Pérez ja muut 2002). Pérez ja

muut eivät löytäneet furaneolia omista mansikkanäytteistään oletettavasti epästabiliuden tai lajikkeiden ja kasvuolosuhteiden erojen takia.

Yamashita ja muut (1997) kertovat esterien löytyvän lähinnä vain kypsemmistä marjoista, sillä niitä muodostavaa entsyymiä ei esiinny raaissa marjoissa. Haihtuvat rasvahapot ovat tärkeä esiaste esterien muodostumiselle mansikassa. Tutkimusryhmä esittää alkoholidehydrogenaasin olevan aktiivisimmillaan marjan kypsemmissä asteissa, mikä lisää alkoholien muodostumista aldehydeistä myöhemmillä kypsyysasteilla. Yamashita ja muut havaitsivat pentanaalin konsentraation vähenevän samalla, kun 1-pentanolin ja sen estereiden määrä nousi kypsymisen edetessä. 1-pentyyliesteriä ei kuitenkaan esiintynyt alle 30 päivän ikäisissä marjoissa. 1-pentyyliasetaattia ja 1-pentyyli-*n*-butyraattia löydettiin runsaasti 30–40 päivän ikäisistä marjoista. Esterien esiintyminen rinnastui marjojen koon ja värin voimakkuuden kanssa: kypsemmistä (yli 30 päivän ikäisistä) marjoista löytyi runsaimmin estereitä ja olivat suurimpia, tummempia sekä mansikanmakuisia. Kypsymisen edetessä myös haihtuvien rasvahappojen määrä nousi. Etikkahappoa ja voihappoa esiintyi vain pienissä määrin alle 30 päivän ikäisissä marjoissa, mutta kypsemmissä marjoissa niiden konsentraatio oli moninkertainen. (Yamashita ja muut 1977.)

## 1.6 Olosuhteiden vaikutus haihtuviin yhdisteisiin keräyksen jälkeen

### 1.6.1 Mustaherukka, *Ribes nigrum*

Pagès-Hélary ja muut (2022) kartoittivat parinkymmenen mustaherukan haihtuviin yhdisteisiin liittyvän tutkimuksen tuloksia. Muun muassa yhdisteet karyofylleeni,  $\alpha$ -terpineoli,  $\alpha$ -terpinene ja (*Z*)-2-heksenaali olivat tunnistettavissa vain tuoreissa mustaherukoissa, pakastettuihin verrattuna. Nämä yhdisteet luokitellaan oleellisiksi mustaherukan haihtuviksi yhdisteiksi, mutta niiden poissaolo ei kuitenkaan muuttanut olennaisesti marjan tuoksuprofiilia. (Pagès-Hélary, Dujourdy ja Cayot, 2022.)

Kontrolloidussa ympäristössä (CO<sub>2</sub> ja O<sub>2</sub> suhdetta muutettu) säilytettyjen mustaherukoiden terpeenialkoholien synteesi estyi alhaisen happitason tai korkean hiilidioksiditason myötä. Alhainen happitaso vaikutti etenkin eukalyptolin ja terpineeni-4-olin määrään negatiivisesti. Samojen yhdisteiden määrät kuitenkin kaksinkertaistuivat normaalissa ilmassa säilytetyissä marjoissa. Terpeenialkoholien lisäksi kuuden viikon ajan normaali-ilmassa säilytetyissä

herukoissa terpeniesterien kokonaismäärät kasvoivat. Normaali-ilmassa tai kontrolloidussa ympäristössä säilyttäminen ei vaikuttanut merkitsevästi monoterpeenien määrään. Säilytysajan pidentäminen kolmesta kuuteen viikkoon vähensi monoterpeenien määriä jopa puolella ja erityisesti alhaisessa O<sub>2</sub>:ssa määrä väheni jo kolmen viikon aikana. Juuri poimittujen marjojen ja kolme viikkoa alhaisessa O<sub>2</sub>:ssa ja korkeassa CO<sub>2</sub>:ssa säilytettyjen marjojen yksittäisissä monoterpeeneissä oli eroja: tuoreet marjat sisälsivät runsaimmin 3-kareenia, α-pineeniä ja β-myrrseeniä, kun taas säilötyissä oli runsaimin β-pineeniä, D-limoneenia ja β-symeeniä. Tuoreet marjat sisälsivät myös merkitsevästi enemmän seskviterpeenejä kuin kontrolloidussa ympäristössä säilytetyt. Kolmen ja kuuden viikon säilytys laski merkitsevästi alkoholien määrää muissa paitsi alhaisen O<sub>2</sub>-tason ympäristössä. (Harb, Bisharat ja Streif, 2008.)

Marsol-Vall ja muut (2019) totesivat ettei vuoden mittainen säilytys +4 °C vaikuta olennaisesti haihtuviin yhdisteisiin tai niiden aistinvaraisiin ominaisuuksiin mustaherukkamehussa. Muun muassa α-pineenin, metyyli- ja etyylibutanaatin määrät laskivat jo ensimmäisen kuukauden jälkeen huoneenlämmössä säilytetyssä käsittelemättömässä mehussa. Nämä yhdisteet tuoksuvat makeilta ja hedelmäisiltä (*The Good Scents Company, TGSC Information System 2021, sähköinen lähde*). Eukalyptolin määrä ei juurikaan muuttunut 12 kuukauden säilytyksen aikana, minkä syynä saattaa olla eukalyptolinen muodostuminen limoneenista ja α-terpineolista happamissa (pH ~ 3) oloissa (Fariña ja muut 2005).

#### 1.6.2 Vadelma, *Rubus idaeus*

Säilytyksen vaikutusta vadelman haihtuviin yhdisteisiin tutkivat Morales ja muut (2014) huomasivat merkittäviä eroja kahden eri vadelmalajikkeen (Sevillana ja Maravilla) välillä. He mittasivat haihtuvien yhdisteiden määriä tuoreesta marjasta, viikon ja kolmen viikon säilytyksen jälkeen 0,5 °C asteessa. Sevillanan ja Maravillan sisältämässä haihtuvissa yhdisteissä tapahtui merkittäviä muutoksia: säilytyksen aikana esterien määrä laski ja terpeenien määrä kasvoi. Monoterpeeneistä erityisesti linaloolin, geraniolin ja L-4-terpineolin määrä nousi viikon mittaisen säilytyksen aikana molemmissa lajikkeissa. Lajikkeiden välillä oli kuitenkin myös eroja, Sevillanassa kokonaishaihtuvien yhdisteiden määrä laski 25 %, kun puolestaan Maravillassa nousi 67 %. Molempien lajikkeiden haihtuvien yhdisteiden profiili muuttui huomattavasti säilytyksen aikana. Heksanaalin, eukalyptolin ja β-jononin määrä kasvoi merkitsevästi viikon ja kolmen viikon

säilytyksen aikana Maravilla, mutta laskivat Sevillanassa. Lajikkeiden haihtuvissa yhdisteissä oli runsaasti eroja jo tuoreissa marjoissa. Säilytyksellä voidaan mahdollisesti vaikuttaa marjan tuoksuprofiiliin, sillä erityisesti terpeenit luovat kukkaisen ja yrttimäisen tuoksun. (Hui ja muut 2010, Morales ja muut 2014.)

### 1.7 Marjojen käsittelyn vaikutus haihtuviin yhdisteisiin

Entsyymien käytöllä voidaan lisätä haihtuvien yhdisteiden määrää, sillä ne vapauttavat muun muassa marjan pektiiniin, selluloosaan ja ligniiniin sitoutuneita haihtuvia yhdisteitä. Marsol-Vall ja muiden (2021) tutkimuksessa todettiin viiden eri entsyymin lisäävän VOC:ien pitoisuuksia puolukasta puristetussa mehussa. Tutkimuksessa käytettiin pektinaasi-, sellulaasi-,  $\beta$ -glukosidaasi-, ksylaasi- ja arabinaasiaktiivisuuden omaavia entsyymejä. Entsyymien annoskoko ja inkubaatioaika ei vaikuttanut oleellisesti haihtuvien yhdisteiden pitoisuuden kasvuun. Entsyymikäsittelyn lisäksi fermentaatiolla voidaan vaikuttaa marjan tuoksuprofiiliin: vuonna 2014 tehdyssä tutkimuksessa Viljanen ja muut havaitsivat entsyymikäsittelyn ja entsyymi sekä fermentaation lisäävän puolukan aistittua makeutta aistinvaraisessa kokeessa. Lisäksi fermentaatio hiivalla lisäsi koettua makeutta. Voin tuoksuisten diasetyylin pitoisuus nousi 7-kertaiseksi hiivalla ja maitohappobakteerilla fermentoiduissa näytteissä. Myös kukkaisen tuoksuisten asetofenonin pitoisuus kaksinkertaistui. Aldehydien määrä puolestaan laski tai pysyi muuttumattoma tutkittavissa näytteissä.

Marjojen ja hedelmien maseraatio eli murskaus saattaa lisätä lipoksygenaasientsyymien vapautumisen myötä vihreän tuoksuisten yhdisteiden kuten heksanaalin ja (E)-2-heksanaalin määriä. Pektinaasin lisääminen edelleen lisää tuoksuvien haihtuvien yhdisteiden muodostumista vapauttamalla niiden glykosididisidottuja esiasteita. Lisäksi esimerkiksi kuivan omenan puristusjätteen käyttäminen mansikoiden, vadelmien ja mustikoiden maseroinnissa lisäsi tuoksuvien estereiden ja hedelmäisten haihtuvien yhdisteiden määriä mehua. Marjamehun kuumennus puolestaan johtaa estereiden ja vihreältä tuoksuvien yhdisteiden hajoamiseen ja lisää karamellimaisten yhdisteiden määriä. (Hui ja muut 2010.)

Suolaus vaikuttaa marjojen haihtuvien yhdisteiden pitoisuuksiin, sillä se vähentää entsyymiaktiivisuutta. Niin sanottujen ”vihreiden tuoksuvien yhdisteiden” eli (Z)-2- ja (E)-2-heksanaalin, heksanolin ja (E)-2- ja (Z)-3-heksenolien määrä oli

kaksinkertainen mustikoissa, joihin ei ollut lisätty suoloja (20 % NaCl ja 1 % NaF) hillitsemään entsyymiaktiivisuutta. NaCl:ia käytettiin inhiboimaan lipoksygenaasin aktiivisuutta ja NaF:a inhiboimaan mikrobin kasvua sekä hillitsemään polyfenolioksidaasin aktiivisuutta. Vihreämpi tuoksu suoloamattomissa marjoissa kävi myös ilmi alustavassa aistinvaraisessa arvioinnissa. (Du ja Rouseff, 2014.) Picon ja muiden (2022) tekemässä tutkimuksessa huomattiin NaCl:n, L-askorbiini- ja sitruunahapon lisäyksen vähentävän heksanaalin ja (E)-2-heksenaalin määrää merkittävästi mustikassa. Samalla,  $\alpha$ -terpineolin ja guajakolin määrät kasvoivat suolauksen myötä.

## 1.8 Tutkimuksen tarkoitus

Puolukan suosio markkinoilla ja ruokapöydässä ei valitettavasti välity tutkimusmaailmaan. Puolukkaa onkin tutkittu suhteellisen vähän muihin *Vaccinium*-marjoihin verrattuna. Puolukan haihtuvista yhdisteistä on tehty vain kymmenkunta tutkimusta, ja ne ovat keskittyneet kvantitoimaan ja kvalifioimaan haihtuvia yhdisteitä. Puolukan aistinvaraisiin ominaisuuksiin keskittyviä tutkimuksia on vain muutama. Haihtuvat yhdisteet ovat tärkeässä osassa maun ja tuoksun aistimisessa. Näiden yhdisteiden konsentraatioon vaikuttaa olennaisesti kasvin genotyyppi, kypsyysaste sekä kasvupaikka ja -olosuhteet. Pohjoisessa ja etelässä kasvaneiden puolukoiden marjojen haihtuvien ja muiden yhdisteiden koostumuksessa on tutkitusti eroja. (Kowalska, 2021.)

Monien marjojen haihtuvista yhdisteistä ja niiden pitoisuuksiin vaikuttavista tekijöistä on runsaasti tutkimustietoa puolukkaan verrattuna. Puolukan yhdisteiden tutkimus ja etenkin sen haihtuvien yhdisteiden kartoitus kaipaa uusia ja kattavia tuloksia. Tämä opinnäyte pyrkii parantamaan tilannetta laajalla katsauksella yleisesti puolukan haihtuviin yhdisteisiin sekä niihin vaikuttaviin tekijöihin. Haihtuvia yhdisteitä on satoja ja jokaisella lajilla on sille ominainen tuoksuprofiili ja muutama tai useampi oleellisesti kyseisen marjan tyypilliseen tuoksuun vaikuttava yhdiste. Nämä yhdisteet eivät välttämättä ole pitoisuuksiltaan korkeita, mutta ovat sitäkin tärkeämpiä marjan ominaisuudelle. Viljeltävien marjojen aistinvaraisia ominaisuuksia voidaan parantaa vaikuttamalla marjan tuoksuprofiiliin muuttamalla muun muassa kasvuolosuhteita, perimää ja valon määrää. Näiden lisäksi VOC:eihin voi vaikuttaa entsyymikäsittelyllä, fermentaatiolla tai vaikka suolauksella.

Tutkielman tarkoituksena oli selvittää kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti puolukan haihtuvat yhdisteet erilaisissa näytteissä. Varsinaisessa tarkkailussa oli Etelä- ja Pohjois-Norjassa Åssa ja Tromssassa kasvaneet puolukan marjat. Tutkimuksen kohteena oli niin lämpötilan, kuin kypsyyssasteen vaikutus haihtuviin yhdisteisiin. Tässä työssä käytettiin SPME-tekniikkaa (engl. *solid-phase microextraction*) eli kiinteäfaasiuuttoa, jossa marjanäytteen haihtuvat yhdisteet kerätään kuidun avulla. Yhdisteet analysoitiin ja tunnistettiin GC-MS:llä.

## 2 Materiaalit ja menetelmät

### 2.1 Näytteiden hankinta ja alkuperä

Norjalaiset puolukat saatiin Norjasta osana Wildberry-projektia kahdelta eri paikkakunnalta. Marjat kerättiin Åssa ja Tromssassa aikavälillä 23.7.-17.9.2020. Näytteitä kerättiin kolmelta eri kasvualueelta (A, B ja C) paikkakunnan sisällä. Eri kypsyysasteita oli viisi: vihreä/valkoinen, punertava, punainen, tulipunainen ja tummanpunainen (ylikypsä). Marjojen kasvupaikkojen koordinaatit otettiin ylös. Fytotronissa kasvaneet marjat luokiteltiin kasvu- ja kasvulämpötilan (9 °C tai 15 °C) sekä käytetyn fytotronin (A, B ja C) mukaan (TAULUKKO 2). Marjat säilytettiin -20 asteessa näytteiden tekoon asti.

TAULUKKO 1. Norjan kypsyysasteen puolukkanäytteiden paikkatiedot, keräämisajankohta sekä kypsyysaste.

Paikka	Alue	Kypsyys	Kuvaus	Koordinaatit	Keräämisaika
Ås	A	1	Vihreä/valkoinen	5936394N, 1048336E	23.07.2020
Ås	B	1	Vihreä/valkoinen	5936484N, 1048326E	23.07.2020
Ås	C	1	Vihreä/valkoinen	5938175N, 1048590E	24.07.2020
Ås	A	2	Punertava	5936394N, 1048336E	24.07.2020
Ås	B	2	Punertava	5936484N, 1048326E	24.07.2020
Ås	C	2	Punertava	5938175N, 1048590E	24.07.2020
Tr	-	2	Punertava	Kvaløya/Krabbenes	25.09.2020
Ås	A	3	Punainen	5936394N, 1048336E	08.08.2020
Ås	B	3	Punainen	5936484N, 1048326E	08.08.2020
Ås	C	3	Punainen	5938175N, 1048590E	08.08.2020
Tr	-	3	Punainen	Kvaløya/Krabbenes	25.09.2020
Ås	A	4	Tulipunainen	5936394N, 1048336E	27.08.2020
Ås	B	4	Tulipunainen	5936484N, 1048326E	27.08.2020
Ås	C	4	Tulipunainen	5938175N, 1048590E	27.08.2020
Tr	-	4	Tulipunainen	Kvaløya/Krabbenes	25.09.2020
Ås	A	5	Tulipunainen	5936394N, 1048336E	17.09.2020
Ås	B	5	Tulipunainen	5936484N, 1048326E	17.09.2020
Ås	C	5	Tulipunainen	5938175N, 1048590E	17.09.2020
Tr	-	5	Tulipunainen	Kvaløya/Krabbenes	-

TAULUKKO 2. Fytotroninäytteiden laitetiedot, keräämisajankohta ja -vuosi sekä paikkakunta.

<b>Paikka</b>	<b>Lämpötila</b>	<b>Laite</b>	<b>Fytotroni</b>	<b>Keräämisaika</b>
Ås	15	A	SKP, Ås	14.08.-21.08.2020
Ås	15	B	SKP, Ås	14.08.-21.08.2020
Ås	15	C	SKP, Ås	14.08.-21.08.2020
Ås	9	A	SKP, Ås	14.08.-21.08.2020
Ås	9	B	SKP, Ås	14.08.-21.08.2020
Ås	9	C	SKP, Ås	14.08.-21.08.2020
Tr	15	A	Holt, Tromssa	01.09.-11.09.2020
Tr	15	B	Holt, Tromssa	01.09.-11.09.2020
Tr	15	C	Holt, Tromssa	01.09.-11.09.2020
Tr	9	A	Holt, Tromssa	01.09.-11.09.2020
Tr	9	B	Holt, Tromssa	01.09.-11.09.2020
Tr	9	C	Holt, Tromssa	01.09.-11.09.2020



## 2.2 Näytteiden valmistaminen ja GC-MS –ajo

2 grammaan hieman sulaneita puolukoita lisättiin 10 µl sisäisiä standardeja (100,25 µg/ml 4-metyyli-2-pentanolia (Sigma-Aldrich, Ranska) ja 112,5 µg/ml neryylliasetaattia (Sigma-Aldrich, Ranska)). Tämän jälkeen marjat murskattiin metallisella tikulla ja vorteksoitiin 5 sekuntia. Jokaisesta näytteestä valmistettiin neljä rinnakkaisnäytettä. Lisäksi valmistettiin sekoitus useasta haihtuvasta yhdisteestä, joita käytettiin apuna retentioindeksien laskemisessa. 1 µl *p*-symeeniä, heksanaalia, α-pineenia, 1-okten-3-olia, eukalyptolia, (Z)-2-heksenaalia, pentaanihappoa, 2,4-heptadienaalia, 2-metyylibutanaalia ja (Z)-karyofylleeniä (Sigma-Aldrich, Ranska) sekoitettiin 2 ml Milli-Q –vettä.

Kaasukromatografina käytettiin Trace 1310 GC (Thermo Scientific, Yhdysvallat) ja massadetekronia ISQ 7000 Single Quadruple Mass Spectrometer (Thermo Scientific, Yhdysvallat). Näytteitä tasapainotettiin 45 asteessa 10 min ajan ja kuidun annettiin uuttaa yhdisteitä 45 °C 30 minuuttia. Näytteet uutettiin DVB/CAR/PDMS SPME -kuidulla (24Ga,  $d_f$  50/30 µm, StableFlex, 2 cm ja neulakoko Supelco, Yhdysvallat). Injektorin lämpötila 220 °C ja kantokaasu helium splitless-injektoituna. Heliumin virtausnopeus 1,60 ml/min. Tämän jälkeen näytteet siirtyivät J&W DB-WAX-kolonneihin (60 m × 0,25 µm × 0,25 mm, Agilent, Yhdysvallat). Uunin aloituslämpötilana oli 50 °C, minkä jälkeen uunin lämpötilaa nostettiin 5 °C/min aina 200 °C asti. 14 minuutin odotusajan jälkeen näytteet ionisoitiin. Siirtolinjan lämpötila 220 °C ja näytteiden ionisointi suoritettiin 70 eV. Ionilähteen lämpötilana käytettiin 220 °C ja massaspektrometrin 240 °C. Yhdisteiden detektointi suoritettiin 33-300 *m/z* alueella.

## 2.3 Yhdisteiden tunnistus ja varmistus

Alustava tunnistus tehtiin vertaamalla saatua MS-spektriä NIST20 Mass Spectral Library:n (National Institute of Standards and Technology) referenssispektreihin. Yhdisteiden tunnistus varmistettiin NIST-tietokannasta vertaamalla saatuja retentioindeksejä (RI) mahdollisimman samankaltaisissa olosuhteissa ajettujen yhdisteiden RI-arvoihin. Retentioindeksien laskemiseen käytettiin C7-C30 Saturated Alkanes (Sigma-Aldrich, Yhdysvallat). Lopuksi yhdisteiden piikit identifioitiin ja integroitiin manuaalisesti Chromeleon-ohjelmalla (7.2.10, Thermo Scientific, Sveitsi).

## 3 Tulokset

### 3.1 Haihtuvien yhdisteiden kvantitointi ja kvalitointi SPME-GC/MS:lla

Haihtuvia yhdisteitä tunnistettiin yhteensä 60, joista suurimmat yhdisteluokat olivat aldehydit, esterit, alkoholit ja terpeenit. Aldehydejä ja estereitä tunnistettiin molempia 13, alkoholeja 12, terpeenejä 11, karboksyylihappoja 8 ja ketoneita kolme. Heteroaromaattisia yhdisteitä tunnistettiin vain yksi (2-etyylifuraani). Taulukkoon 3 on koottu tunnistettujen yhdisteiden retentioindeksit ja niiden referenssit sekä tuoksureferenssit *The Good Scents Company*lta. Orgaanisia happoja tunnistettiin 8, ketoneita kolme ja aromaattisia yhdisteitä kaksi. 3- ja 2-heksenaalit tunnistettiin NIST:n tietokantojen avulla, mutta sopivaa retentioindeksin referenssiä ei löytynyt. Tiettyjä yhdisteitä, kuten dodekaanihapon estereitä ja sitronnellonia löydettiin näytteistä vain vähäisissä määrissä.

Vuonna 1969 Anjou ja Sydow määrittivät aldehydit runsaslukuisammaksi yhdisteluokaksi puolukassa. Aldehydien jälkeen tulivat alkoholit, terpeenit ja ketonit. Bentsoehappo, bentsyylialkoholi, bentsaldehydi, 2-metyyli-3-buten-2-oli ja linalooli olivat heidän tutkimuksessaan suuripitoisimmat yhdisteet. Myös tässä tutkimuksessa samaiset yhdisteet löytyvät suurimmissa konsentraatioissa. Bentsoehappo kattoi jopa 45 % kaikista haihtuvista yhdisteistä kuten esimerkiksi näytteissä Tr 15A ja Tr 15B. Bentsoehapon vaikutus karpalon tuoksuun osoittautui suhteellisen voimaakkaaksi Zhun ja muiden tutkimuksessa (2016). Se sijoittui 9:ksi karpalon tuoksuun voimakkaimmin vaikuttavaksi yhdisteeksi. Tutkijat kuvailivat bentsoehapon tuoksua makeaksi ja hunajaiseksi. The Good Scents Company puolestaan kuvailee yhdisteen tuoksua balsamia ja virtsaa muistuttavaksi.

Viljanen ja muut (2014) ilmoittavat tutkimuksessaan etanolin, metyylibentsoaatin, etyyliasetaatin, bentsyylialkoholin, bentsaldehydin ja 3-metyylibutaanin runsaimmiksi yhdisteiksi puolukassa. Muun muassa metyylibentsoaatti on metanolin ja bentsoehapon muodostama esteri ja kumpaakin sen esiastetta esiintyy yleisesti kypsissä tai ylikypsissä marjoissa (Horvat ja Senter 1985).

Marjojen painoon vaikuttaa olennaisesti kypsyysaste, kuten nähdään kuviosta 2. Raa'at ja vihertävät marjat ovat selvästi muiden kypsyysasteen marjoja kevyempiä: raa'at marjat painavat keskimäärin 0,16 grammaa kun taas ylikypsä marja painaa 0,23–0,38 grammaa. Muun muassa sokerien määrä kasvaa jopa 40-kertaisesti marjan kypsyessä raa'asta ylikypsäksi ja vaikuttaa osaltaan marjan painoon (Matthews ja muut 1970). Fytotronissa kasvaneiden puolukoiden marjojen painot eivät eroa toisistaan erityisesti, sillä marjat olivat kypsyysasteeltaan samaa luokkaa. Fytotronissa kasvatettujen puolukoiden painot kuvattu kuviossa 3. Voidaan siis olettaa, että suurin vaikuttava tekijä marjan painoon on sen kypsyysaste.

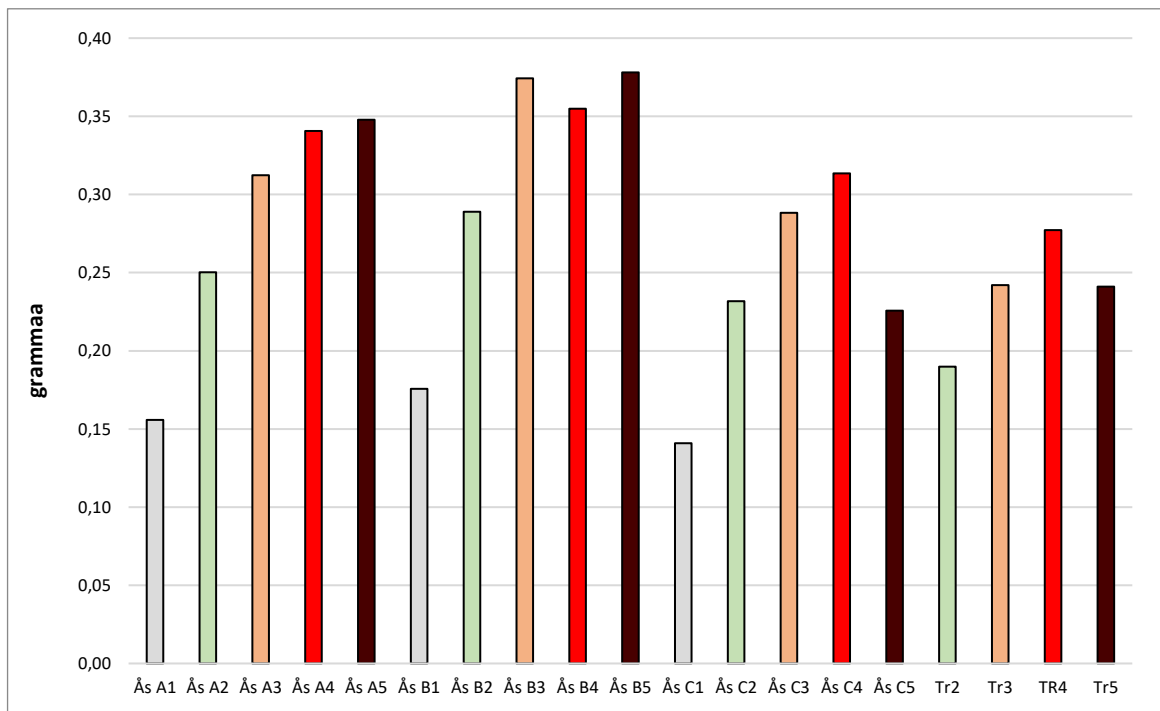
TAULUKKO 3. SPME/GC-MS:llä mitattujen puolukan haihtuvien yhdisteiden retentioindeksit, peruspiikit, referenssit ja tuoksut.

RI <sup>a</sup>	referenssi RI	Yhdiste	BP <sup>d</sup>	Kirjallisuuslähde	Tuoksu <sup>e</sup>
722	690	Asetaldehydi	44,05	Rizzolo, Cambiagli, ja muut 2005	Pistävä, eetteri, raikas ja hedelmä
819	818	2-metyylipropanaali	43,05	Umano, Hagi, ja muut 2000	Raikas, kukkaisu ja vihreä
893	885	Etyyliasettaatti	43,04	Shimoda, Shiratsuchi, ja muut 1993	Eetteri, hedelmä ja rypäle
918	910	2-metyylibutanaali	57,05	Hayata, Sakamoto, ja muut 2002	Tunkkainen, suklaa ja pähkinä
923	914	3-metyylibutanaatti	44,05	Shimoda, Shiratsuchi, ja muut 1993	Eetteri, aldehydi ja suklaa
961	944	2-etyylifuraani	81,02	Horiuchi, Umano, ja muut 1998	Kemiallinen ja mallas
1027	1027	$\alpha$ -Pineeni	55,03	Shimizu, Imayoshi, ja muut 2009	Puu, mänty ja täppä
1028	1022	1-penten-3-oni	55,00	Ganeko, Shoda, ja muut 2008	Pistävä, eetteri, pippuri ja sipuli
1042	1035	Butaanihapon etyyliesteri	43,07	Paniandy, Chane-Ming, ja muut 2000	Hedelmä, mehevä ja konjakki
1046	1030	1-propanoli	42,08	Binder, Flath, ja muut 1989	Alkoholi, fermentoitunut ja hiiva
1047	1036	2-metyyli-3-buten-2-oli	71,04	Umano, Hagi, ja muut 2002	Yritti, multa ja öljy
1070	1063	Kamfeeni	93,04	Wei A. ja Shibamoto T., 2007	Kamferi, viileä ja mänty
1087	1084	Heksanaali	56,03	Rizzolo, Cambiagli, ja muut 2005	Vihreä, rasva ja vihannes
1105	1112	$\beta$ -Pineeni	93,07	Shimizu, Imayoshi, ja muut 2009	Viileä, puu ja minttu
1124	1130	3-metyylibutyli asetaatti	43,05	Wada ja Shibamoto, 1997	Makea, banaani ja hedelmä
1136	1121	(E)-2-pentenaali	55,05	Horiuchi, Umano, ja muut 1998	Pistävä, vihreä ja omena
1148	<sup>b</sup>	3-heksanaali	41,04	<sup>b</sup>	Ruoho, vihreä ja omena
1198	1202	D-limoneeni	68,06	Shimizu, Imayoshi, ja muut 2009	Makea ja sitrus
1214	1204	Eukalyptoli	43	Cai, Lin, ja muut 2006	Yrttinen ja lääke
1215	1236	3-metyyli-1-butanoli	45,06	Wada ja Shibamoto, 1997	Alkoholi, pistävä ja hedelmä
1236	1236	Heksaanihapon etyyliesteri	41,08	Paniandy, Chane-Ming, ja muut 2000	Makea, hedelmä ja vaha

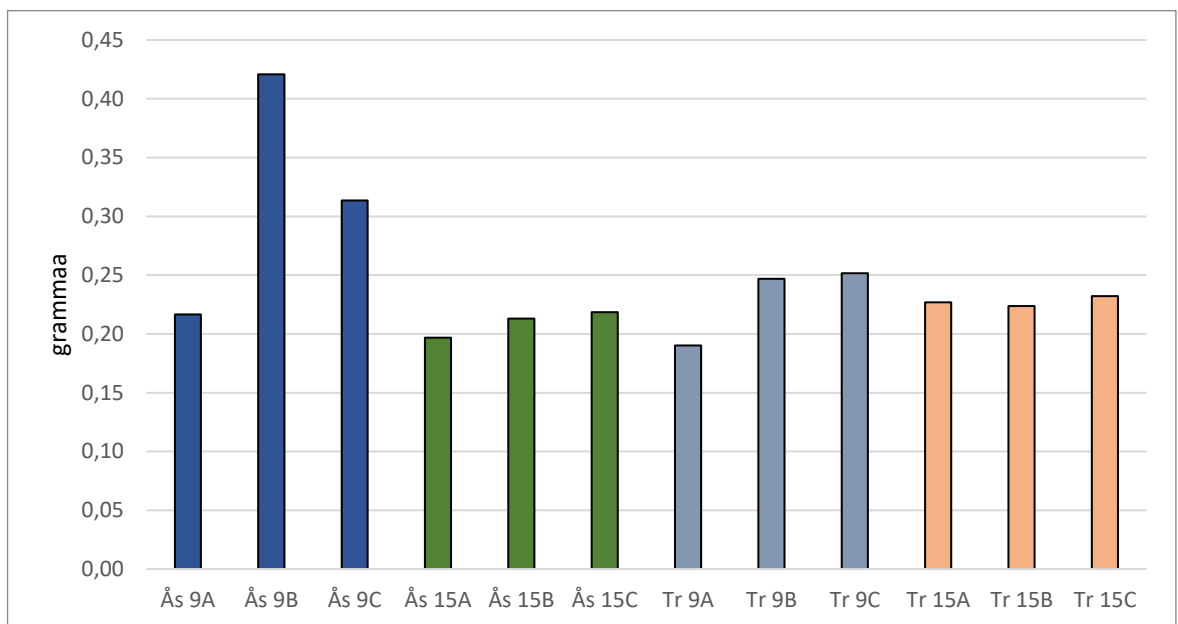
RI <sup>a</sup>	referenssi RI	Yhdiste	BP <sup>d</sup>	Kirjallisuuslähde	Tuoksu <sup>e</sup>
1245	1251	γ-Terpineeni	93,06	Christoph, 2001	Sitrus, puu ja kamfori
1257	1259	1-pentanol	42,01	Chyau ja Mau, 2001	Pistävä, fermentoitunut, hiiva ja liuotin
1270	1265	p-symeeni	119,1	Cai, Lin, ja muut 2006	Kemikaalinen, mauste ja sitrus
1276	1271	Heksyyliasettaatti	43,03	Hayata, Sakamoto, ja muut 2002	Vihreä, hedelmä ja makea
1295	1287	Asetoiini	45,04	Wada ja Shibamoto, 1997	Makea, kerma ja rasva
1316	1318	(Z)-3-heksenyli asetaatti	43,04	Paniandy, Chane-Ming, ja muut 2000	Rasva, vihreä ja makea hedelmä
1341	1332	6-metyyli-5-hepten-2-oni	43,02	Binder, Turner, ja muut 1990	Sitrus, vihreä ja tunkkainen
1361	1345	1-heksanol	56,07	Ravichandran ja Parthiban, 1998	Pistävä, eetteri, alkoholi ja makea
1397	1397	Nonanaali	57,07	Chyau ja Mau, 2001	Vaha, sitrus ja raikas vihreä
1405	1398	(E,E)-2,4-heksadienaali	81,02	Paniandy, Chane-Ming, ja muut 2000	Vihreä, hedelmä, sitrus ja vaha
1415	1405	(E)-2-heksen-1-oli	67,05	Ravichandran ja Parthiban, 1998	Raikas, rasva, vihreä ja öljy
1438	1430	(E)-2-oktanaali	55,05	Chyau ja Mau, 2001	Raikas, rasva, vihreä ja yrtti
1442	1443	Oktaanihapon etyyliesteri	41,07	Wada ja Shibamoto, 1997	Vaha, makea, tunkkainen ja hedelmä
1454	1454	1-okten-3-oli	57,05	Chyau ja Mau, 2001	Multa, vihreä ja öljy
1457	1448	Etikkahappo	43,03	Cai, Lin, ja muut 2006	Terävä, pistävä ja hapan
1472	1508	(E,E)-2,4-heptadienaali	81,02	Chyau ja Mau, 2001	Rasva, vihreä ja öljy
1485	1471	trans-Linaloolioksidi	59,06	Umano, Nakahara, ja muut 1999	Puu, kukkaisu ja viileä
1538	1535	Bentsaldehydi	105,06	Wada ja Shibamoto, 1997	Manteli, hedelmä ja pähkinä
1611	1601	Karyofylleeni	83,01	Shimizu, Imayoshi, ja muut 2009	Makea, puu ja mauste
1616	1612	Terpineeni-4-oli	71,06	Wei A. ja Shibamoto T., 2007	Puu, setripuu ja mentoli
1623	1615	(E)-2-okten-1-oli	57,04	Umano, Hagi, ja muut 2000	Vihreä, sitrus ja rasva
1642	1641	Bentsoehapon metyyliesteri	105,03	Wei A. ja Shibamoto T., 2007	Kemikaalinen, fenoli ja kirsikka
1646	1637	Dekaanihapon etyyliesteri	45,06	Wada ja Shibamoto, 1997	Makea, vaha ja hedelmä

RI <sup>a</sup>	referenssi RI	Yhdiste	BP <sup>d</sup>	Kirjallisuuslähde	Tuoksu <sup>e</sup>
1673	1656	Asetofenoni	77,02	Sekiwa, Kubota, ja muut 1997	Makea, marsipaani ja kumariini
1685	1656	Bentsoehapon etyyliesteri	45,06	Binder ja Flath, 1989	Makea, ikivihreä ja hedelmä
1749	1743	Pentaanihappo	60,01	López, Ezpeleta, ja muut 2004	Hapan, terävä, juusto ja tupakka
1774	769	1-dekanoli	55,08	Werkhoff, Güntert, ja muut 1998	Rasva, vaha, hedelmä ja makea
1779	1766	Sitronelloni	41,07	Christoph, 2001	Kukkaisa, makea ja sitrus
1814	1814	Dodekaanihapon metyyliesteri	45,06	Choi 2004	Vaha, saippua ja kerma
1839	1828	Fenetyyliasettaatti	104,08	Wada ja Shibamoto, 1997	Makea, kukkaisa ja hiiva
1856	1843	Dodekaanihapon etyyliesteri	88,08	López, Ezpeleta, ja muut 2004	Makea, vaha ja hedelmä
1859	1852	Heksaanihappo	60,01	Wada ja Shibamoto, 1997	Hapan, rasva ja juusto
1895	1879	Bentsyylialkoholi	79,05	Wada ja Shibamoto, 1997	Makea, kukkaisa ja hedelmä
1939	1930	Fenetyylialkoholi	45,06	Wada ja Shibamoto, 1997	Makea, kukkaisa, raikas ja leipä
1965	1956	Heptaanihappo	60,02	Sekiwa, Kubota, ja muut 1997	Juusto, vaha, fermentoitunut ja hedelmä
2064	2072	Oktaanihappo	45,06	Wada ja Shibamoto, 1997	Rasva, vaha ja eltaantunut
2168	2165	Nonaanihappo	73,03	Dregus ja Engel, 2003	Vaha, lika ja juusto
2499	2420	Bentsoehappo	105,01	Krammer, Winterhalter, ja muut 1991 <sup>c</sup>	Balsami ja virtsa

a Mitattu retentioindeksi, b ei referenssi-RI:tä, c referenssilähteessä käytetty 30m kolonnia, d peruspiikki (engl. Base peak) ja e tuoksukuvailut The Good Scents Companylta.



KUVIO 2. Marjojen keskimääräinen paino (g) kypsyysastenäytteissä Åsasta ja Tromssasta. Eri kypsyysasteet: vihreä/valkoinen, punertava, punainen, tulipunainen ja tummanpunainen (ylikypsä).

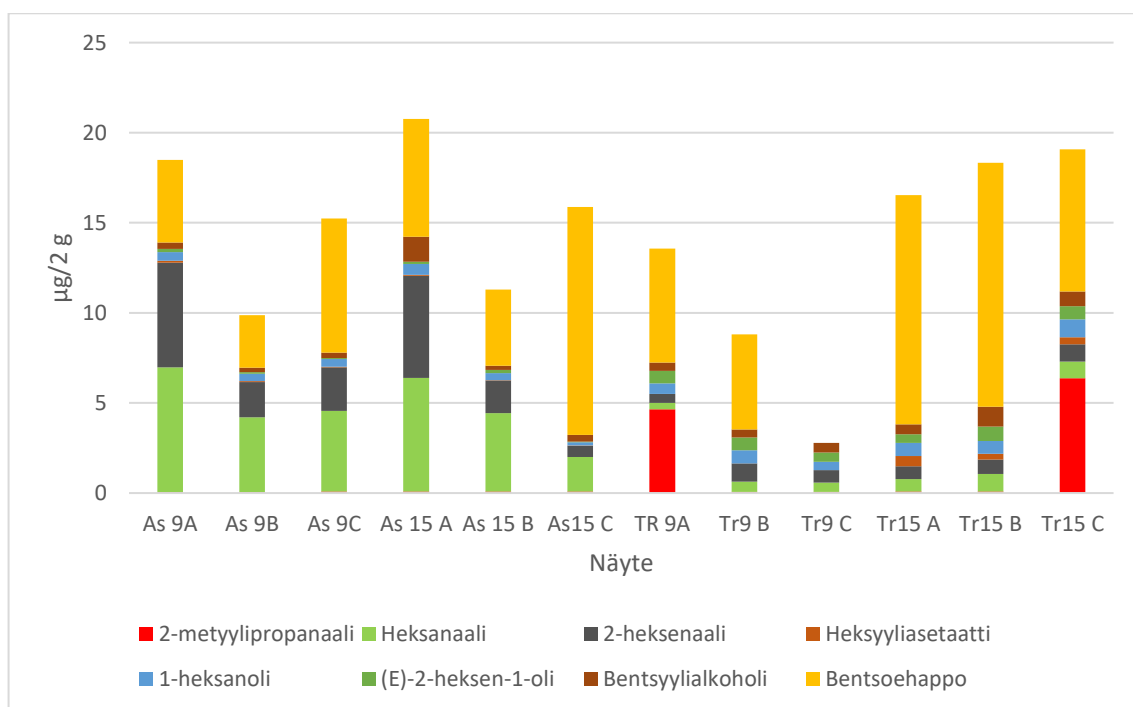


KUVIO 3. Marjojen keskimääräinen paino (g) fytotroninäytteissä Åsasta ja Tromssasta 9° ja 15° asteessa.

### 3.2 Fytotroninäytteet: 9 °C ja 15 °C

Kontrolloiduissa kasvuolosuhteissa kasvaneista puolukoista tunnistettiin yhteensä 35 eri haihtuvaa yhdistettä. Runsaslukuisemmaksi yhdisteluokaksi

nousi esterit ja alkoholit, joita kumpaakin tunnistettiin 9. Aldehydit ja terpeenit olivat seuraavina. Aldehydejä tunnistettiin 6 ja terpeenejä 5. Ketoneita tunnistettiin vain kaksi ja karboksyylihappoja neljä. Kuvioon 4 on koottu muutamia fytotroninäytteiden suuripitoisimpia yhdisteitä. Kuvaajasta näkee, että bentsoehappo esiintyy suurissa pitoisuuksissa muihin yhdisteisiin verrattuna. Bentsoehapon lisäksi näytteistä löytyi runsaasti heksanaalia, 2-heksenaalia ja 2-metyylipropanaalia. Muiden haihtuvien yhdisteiden pitoisuus oli vain murto-osa edellä mainituista yhdisteistä. Bentsoehapon pitoisuus oli keskimäärin suurempi 15 asteen näytteissä kuin 9 asteessa kasvaneissa. Tromssan 15 asteen näytteissä bentsoehapon osuus oli reilusti yli puolet kaikista haihtuvista yhdisteistä. Tr9 B:ssä ja Tr15 C:ssä oli huomattavasti enemmän vihreän ja raikkaan tuoksuista 2-metyylipropanaalia. Vihreän tuoksuista yhdisteistä, kuten heksanaali ja 2-heksenaali löytyi runsaammin Åsin näytteistä kuin Tromssan lämpötilasta huolimatta. Taulukkoihin 4 ja 5 on koottu fytotroninäytteistä tunnistetut haihtuvat yhdisteet.



KUVIO 4. Fytotronissa kasvatettujen näytteiden suuripitoisimmat haihtuvat yhdisteet Åsasta ja Tromssasta. Näytteitä kasvatettiin joko 15 tai 9 asteessa kolmessa eri laitteessa (A-B). Kirjaimet A-C kuvaavat eri kasvupaikkoja paikkakuntien sisällä.



TAULUKKO 4. Fytotroninäytteet A. SPME/GC-MS:llä mitattujen puolukan haihtuvien yhdisteiden pitoisuudet ( $\mu\text{l}/2\text{ g}$ ) näytteittäin.

Yhdiste	Ås 9A	Ås 9B	Ås 9C	Ås 15A	Ås 15B	Ås 15C
Asetaldehydi	0,2±0,051	0,167±0,022	0,179±0,03	0,359±0,135	0,209±0,209	0,416±0,416
2-metyylipropanaali	0,041±0,006	0,041±0,005	0,08±0,031	0,082±0,033	0,075±0,075	0,082±0,082
Etyyliasetatti	0,121±0,008	0,102±0,059	0,084±0,046	0,141±0,011	0,104±0,104	0,138±0,138
2-etyylifuraani	0,271±0,072b	0,076±0,025	0,096±0,019	0,26±0,067b	0,084±0,084	0,029±0,029
1-penten-3-oni	0,717±0,145b	0,273±0,128	0,27±0,052	0,709±0,103c	0,373±0,373b	0,138±0,138
Heksanaali	6,943±0,783b	4,157±1,309	4,483±0,909	6,304±0,916c	4,366±4,366b	1,921±1,921
3-heksenaali	6,956±1,533b	2,656±0,996	3,144±0,771	5,165±1,381b	2,098±2,098	0,668±0,668
3-metyyli-1-butanoli	-	0,006±0,004	0,007±0,002	0,013±0,013	0,003±0,003	0,034±0,034b
2-heksenaali	5,795±1,711b	1,967±0,787	2,411±0,403	5,669±1,427b	1,8±1,8	0,613±0,613
$\gamma$ -Terpineeni	0,002±0b	0,001±0	0,001±0	0,002±0,001b	0,001±0,001	0,001±0,001
1-pentanol	0,064±0,008	0,057±0,009	0,062±0,01	0,074±0,009	0,077±0,077	0,042±0,042a
p-symeeni	0,002±0,001	0,002±0	0,002±0	0,004±0,001b	0,002±0,002	0,001±0,001
Heksyliasetatti	0,115±0,1	0,046±0,057	0,035±0,022b	0,052±0,03	0,022±0,022	0,019±0,019
Asetoiini	0,007±0,003	0,007±0,002	0,021±0,007b	0,034±0,038	0,006±0,006	0,144±0,144b
1-heksanoli	0,481±0,024b	0,405±0,077b	0,424±0,049	0,607±0,207b	0,39±0,39ab	0,192±0,192a
(E)-2-heksen-1-oli	0,174±0,039b	0,101±0,071b	0,054±0,027	0,125±0,03	0,179±0,179	0,036±0,036a
trans-Linaloolioksidi	0,048±0,018	0,039±0,01	0,035±0,011	0,01±0,003c	-	0,004±0,004b
Bentsaldehydi	0,031±0,002	0,027±0,006	0,031±0,006	0,248±0,378	0,032±0,032	0,021±0,021
Terpineeni-4-oli	0,001±0,001	0,001±0	0,002±0b	0,002±0,001b	-	0,001±0,001
Asetofenoni	0,033±0,019	0,034±0,019	0,044±0,012	0,034±0,019	0,035±0,035	0,034±0,034
Bentsoehapon etyyliesteri	-	-	-	0,001±0,002	-	0,007±0,007b
Pentaanihappo	0,129±0,032	0,071±0,022	0,092±0,037	0,11±0,043	0,153±0,153	0,088±0,088
Sitronelloni	0,002±0,001	0,002±0,001	0,001±0,001	-	-	-
Fenetyliasetatti	-	-	-	0,001±0,001	-	0,001±0,001
Heksaanihappo	0,62±0,1b	0,374±0,084b	0,519±0,068	0,509±0,094	0,525±0,525	0,504±0,504

Yhdiste	Ås 9A	Ås 9B	Ås 9C	Ås 15A	Ås 15B	Ås 15C
<b>Bentsyylialkoholi</b>	0,366±0,039	0,242±0,116	0,301±0,177	1,385±2,158	0,242±0,242	0,364±0,364
<b>Fenetyylialkoholi</b>	-	-	-	0,006±0,009	-	0,001±0,001
<b>Oktaanihappo</b>	0,04±0,01	0,032±0,006	0,04±0,009	0,048±0,01	0,037±0,037	0,054±0,054
<b>Bentsoehappo</b>	4,572±1,972	2,92±1,232	7,455±3,263	6,54±3,817	4,216±4,216	12,646±12,646
<b>Kokonaispitoisuus</b>	37,734±5,014	23,806±3,095	29,875±5,28	38,495±9,532	25,029±25,029	28,195±28,195

Kirjaimet b ja c tarkoittavat yhdisteiden keskiarvojen olevan eri ryhmissä ja eroavan tilastollisesti toisistaan. Kirjaimeton tulos (eli a-ryhmä) on myös omassa ryhmässään ja tilastollisesti poikkeaa muista ryhmistä. Tilastollinen analyysi suoritettu kolmen näytteen sarjassa (Ås 9A-9C ja Ås 15A-15C).

TAULUKKO 5. Fytotroninäytteet B. SPME/GC-MS:llä mitattujen puolukan haihtuvien yhdisteiden pitoisuudet ( $\mu\text{l}/2\text{ g}$ ) näytteittäin.

Yhdiste	Tr 9A	Tr 9B	Tr 9C	Tr 15A	Tr 15B	Tr 15C
Asetaldehydi	0,072±0,019	0,059±0,059	0,06±0,06	0,061±0,013	0,056±0,011	0,075±0,01
2-metyylipropanaali	4,658±7,656	0,059±0,059	0,06±0,06	0,077±0,009	0,079±0,011	6,374±8,832
Etyyliasetatti	0,134±0,012	0,127±0,127	0,134±0,134	0,13±0,014	0,096±0,008a	0,115±0,002
2-etyylifuraani	0,013±0,004	0,033±0,033b	0,018±0,018	0,018±0,006	0,017±0,004	0,027±0,007
1-penten-3-oni	0,052±0,027	0,072±0,072	0,054±0,054	0,085±0,023	0,081±0,013	0,149±0,051
Voihapon etyyliesteri	0,002±0	0,002±0,002	0,001±0,001	0,001±0	0,001±0,001	0,002±0
1-propanoli	-	-	-	-	0,001±0	0,002±0,001
Heksanaali	0,339±0,252	0,579±0,579	0,527±0,527	0,704±0,178	0,983±0,301	0,917±0,563
3-heksenaali	0,144±0,088	0,314±0,314	0,262±0,262	0,184±0,061	0,191±0,051	0,274±0,073
3-metyyli-1-butanoli	0,038±0,043a	0,038±0,038b	0,006±0,006ab	0,043±0,029	0,041±0,032	0,046±0,025
2-heksenaali	0,509±0,225	1±1	0,685±0,685	0,696±0,192	0,806±0,306	0,972±0,112
$\gamma$ -Terpineeni	0,002±0,001b	0,002±0,002	0,002±0,002	0,045±0,029	0,016±0,016	0,054±0,089
1-pentanol	0,069±0,014	0,052±0,052	0,046±0,046	0,053±0,006	0,053±0,008	0,062±0,008
p-symeeni	-	-	-	0,103±0,063b	0,037±0,039b	-
Heksyliasetatti	-	-	-	0,568±0,237	0,313±0,095	0,382±0,418
Asetoiini	0,037±0,005	0,037±0,037	0,033±0,033	0,069±0,016	0,076±0,015	0,081±0,02
1-heksanol	0,577±0,312ab	0,74±0,74b	0,461±0,461a	0,74±0,225	0,715±0,153	0,991±0,489
(E)-2-heksen-1-oli	0,691±0,465	0,714±0,714	0,513±0,513	0,479±0,171	0,787±0,158	0,738±0,113
Oktaanihapon etyyliesteri	-	-	-	0,002±0,001	0,001±0,001	0,001±0,001
trans-Linaloolioksidi	0,104±0,111b	-	-	0,071±0,018	0,083±0,017	0,079±0,046
Bentsaldehydi	0,033±0,007	0,041±0,041	0,028±0,028	0,038±0,005	0,061±0,045	0,049±0,008
Terpineeni-4-oli	0,208±0,315	0,213±0,213	0,031±0,031	0,002±0,001	0,191±0,194	0,473±0,395
Dekaanihapon etyyliesteri	-	-	-	0,002±0,001	0,002±0,001	0,001±0,001
Asetofenoni	0,066±0,009	0,079±0,079a	0,082±0,082	0,036±0,02	0,068±0,02	0,062±0,009
Bentsoehapon etyyliesteri	0,003±0,002b	0,002±0,002a	-	0,004±0,002	-	0,002±0,002

Yhdiste	Tr 9A	Tr 9B	Tr 9C	Tr 15A	Tr 15B	Tr 15C
<b>Pentaanihappo</b>	0,043±0,023	0,068±0,068	0,054±0,054	0,087±0,034	0,055±0,032	0,08±0,038
<b>1-dekanoli</b>	0,001±0,001	0,001±0,001	0,002±0,002	0,003±0,001	0,003±0	0,004±0,001
<b>Sitronelloni</b>	0,011±0,003	0,006±0,006	0,006±0,006	0,003±0,001	0,003±0,001	0,004±0,001
<b>Fenetyyliasettaatti</b>	-	-	-	0,002±0,001b	0,001±0,001b	-
<b>Dodekaanihapon etyyliesteri</b>	-	-	-	0,001±0,001	0,002±0,001	-
<b>Heksaanihappo</b>	0,204±0,069	0,326±0,326	0,215±0,215	0,422±0,066	0,281±0,137	0,317±0,059
<b>Bentsyylialkoholi</b>	0,466±0,023	0,431±0,431	0,529±0,529	0,54±0,163	1,11±0,704	0,811±0,19
<b>Fenetyylialkoholi</b>	0,003±0	0,002±0,002	0,003±0,003	0,013±0,01	0,01±0,006	0,005±0,001
<b>Oktaanihappo</b>	0,055±0,011	0,026±0,026	0,038±0,038	0,048±0,009	0,047±0,022	0,046±0,008
<b>Bentsoehappo</b>	6,326±6,34	5,282±5,282	-	12,728±1,353	13,545±2,076	7,897±8,152
<b>Kokonaispitoisuus</b>	24,971±11,232	20,335±20,335	16,604±16,604	28,082±2,037	29,845±2,482	31,223±14,633

Kirjaimet a, b ja c tarkoittavat yhdisteiden keskiarvojen olevan eri ryhmissä ja eroavan tilastollisesti toisistaan. Kirjaimeton tulos (eli a-ryhmä) on myös omassa ryhmässään ja tilastollisesti poikkeaa muista ryhmistä. Tilastollinen analyysi suoritettu kolmen näytteen sarjassa (Tr 9A-9C ja Tr 15A-C).

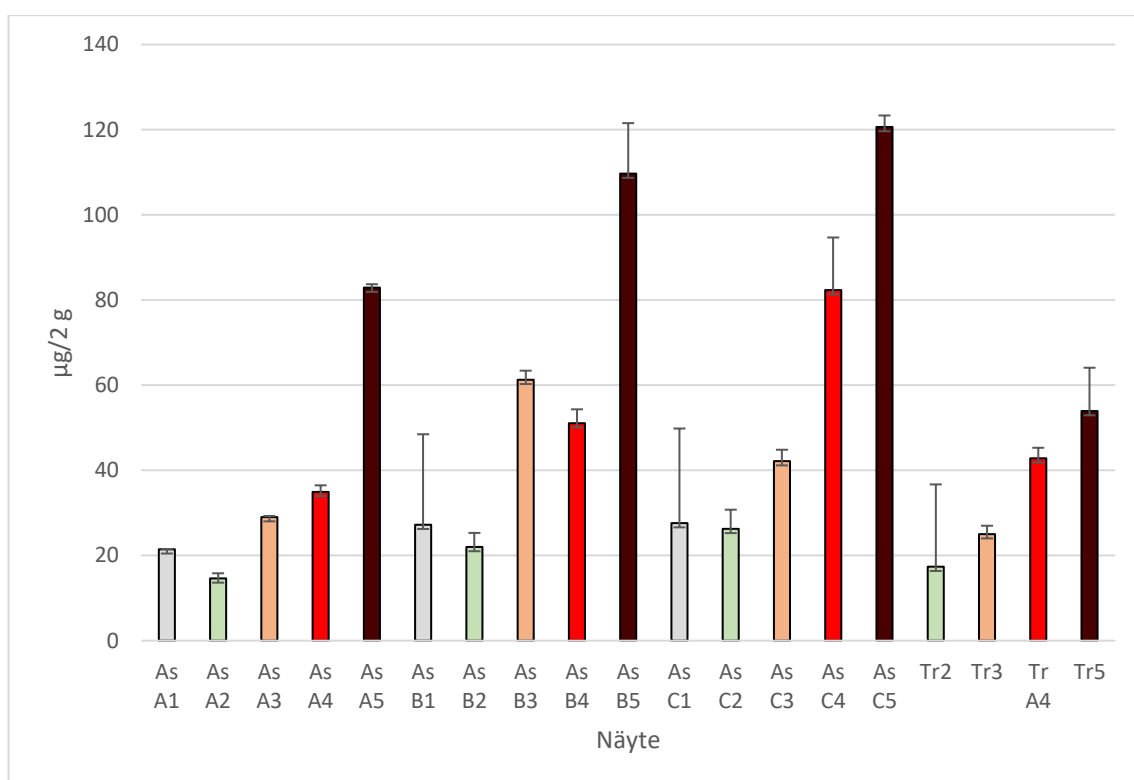
### 3.3 Kypsyysasteen vaikutus haihtuviin yhdisteisiin

Eri kypsyysasteen puolukoissa suurin yhdisteluokka oli aldehydit. Aldehydien jälkeen suurimmat yhdisteluokat olivat alkoholit, terpeenit, esterit ja karboksyylihapot. Yhteensä näytteistä tunnistettiin 53 haihtuvaa yhdistettä. Näistä aldehydejä oli 13, alkoholeja 11, terpeenejä 10, karboksyylihappoja ja estereitä 7. Ketoneja tunnistettiin vain kolme. Bentsoehapon pitoisuus nousi marjan kypsyessä, kuten kuvasta 3 näkyy. Marjan kypsyessä myös muiden karboksyylihappojen pitoisuus nousi: taulukoissa 1 ja 2 ylikypsien näytteiden (A5, B5, C5 ja Tr5) bentsoehapon pitoisuus erosi tilastollisesti merkitsevästi muista näytteistä. Taulukossa kirjaimet a, b, c ja d kertovat näytteen poikkeavan tilastollisesti muista näytesarjan näytteistä. Myös pentaani-, heksaani-, heptaani-, oktaani- ja nonaanihapon pitoisuudet eroavat ylikypsien marjojen ja muiden kypsyysasteiden marjojen pitoisuuksista tilastollisesti merkitsevästi. Ylikypsien marjojen haihtuvien yhdisteiden pitoisuudet poikkesivat useasti tilastollisesti merkitsevästi muista kypsyysasteiden marjoista (TAULUKKO 6).

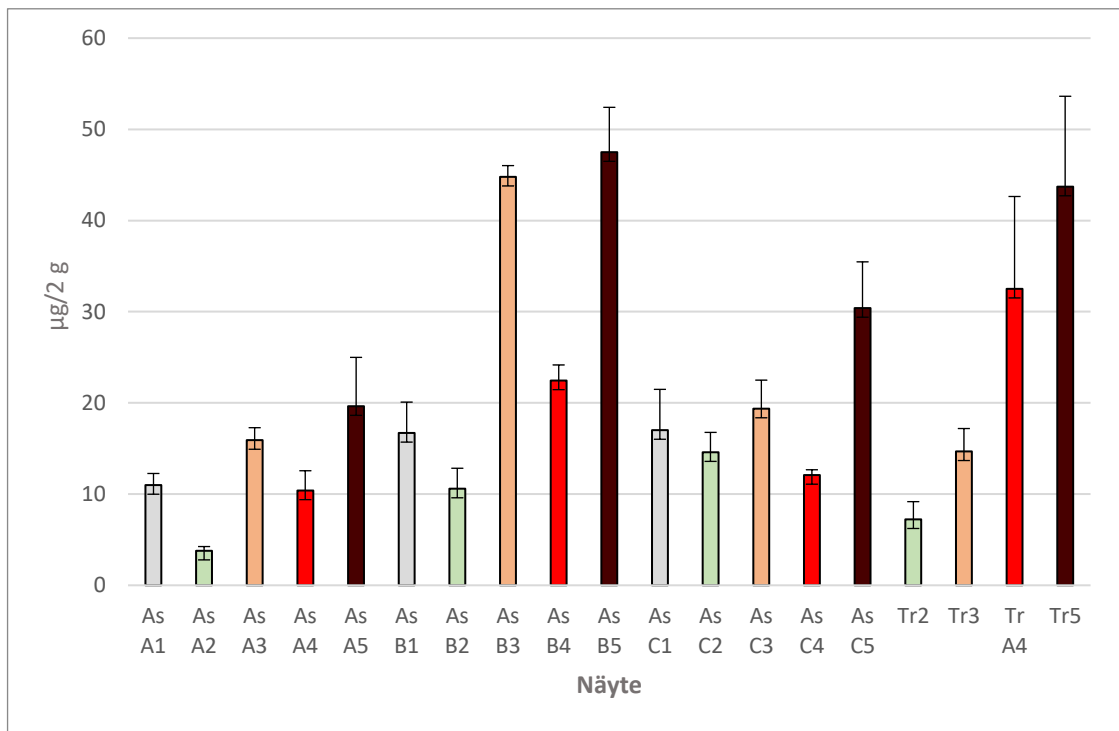
Marjan kypsyminen selvästi lisäsi haihtuvien yhdisteiden kokonaismäärää. Kuviossa 3 esitetään eri kypsyysasteella olevien puolukoiden haihtuvien yhdisteiden kokonaismäärät raa'asta marjasta ylikypsään. Åsin marjat sisältävät keskimäärin enemmän haihtuvia yhdisteitä kuin Tromssan. Lisäksi Åsasta kerättyjen puolukoiden kasvualuiden (A-C) välillä on eroja: alueen C kypsissä ja ylikypsissä puolukoissa esiintyy hieman enemmän haihtuvia yhdisteitä kuin alueiden A ja B puolukoissa. Tromssan kypsissä ja ylikypsissä marjoissa on puolestaan vähemmän haihtuvia yhdisteitä kuin Åssa kasvaneissa. Bentsoehapon pitoisuus oli huomattavasti alhaisempi Tromssan kuin Åsin marjoissa, mikä selittää Tromssan haihtuvien yhdisteiden kokonaispitoisuuden alhaisuuden (KUVIO 7). Kuvasta 6 nähdään, että puolukan ominaisuuteen merkittävästi vaikuttavan 2-metyyliibutaanihapon pitoisuus oli kuitenkin suurempi pohjoisemman leveyspiirin näytteissä Tromssassa kuin Åssa. Yhdisteen pitoisuus nousi marjan kypsyessä. Kuvioon 6 on koottu haihtuvien yhdisteiden kokonaispitoisuudet lukuunottamatta runsaspitoista bentsoehappoa. Nyt huomataan, että Åsin A1-A5 näytteiden muiden VOC:ien kokonaispitoisuus on keskimäärin alhaisempi kuin muiden näytteiden. Tromssan näytteistä löytyi kohtalaisen paljon muita haihtuvia yhdisteitä kuin bentsoehappoa, mutta hajonta oli myös suhteellisen suurta. Vihreän tuoksuista heksanaalia ja muita

rasvahappojen hapettumisen seurauksena syntyneitä yhdisteitä 2- ja 3-heksenaalia esiintyi runsaimmin Åsin alueen B näytteissä. Tromssan näytteissä näiden yhdisteiden määrät olivat suhteellisen pieniä.

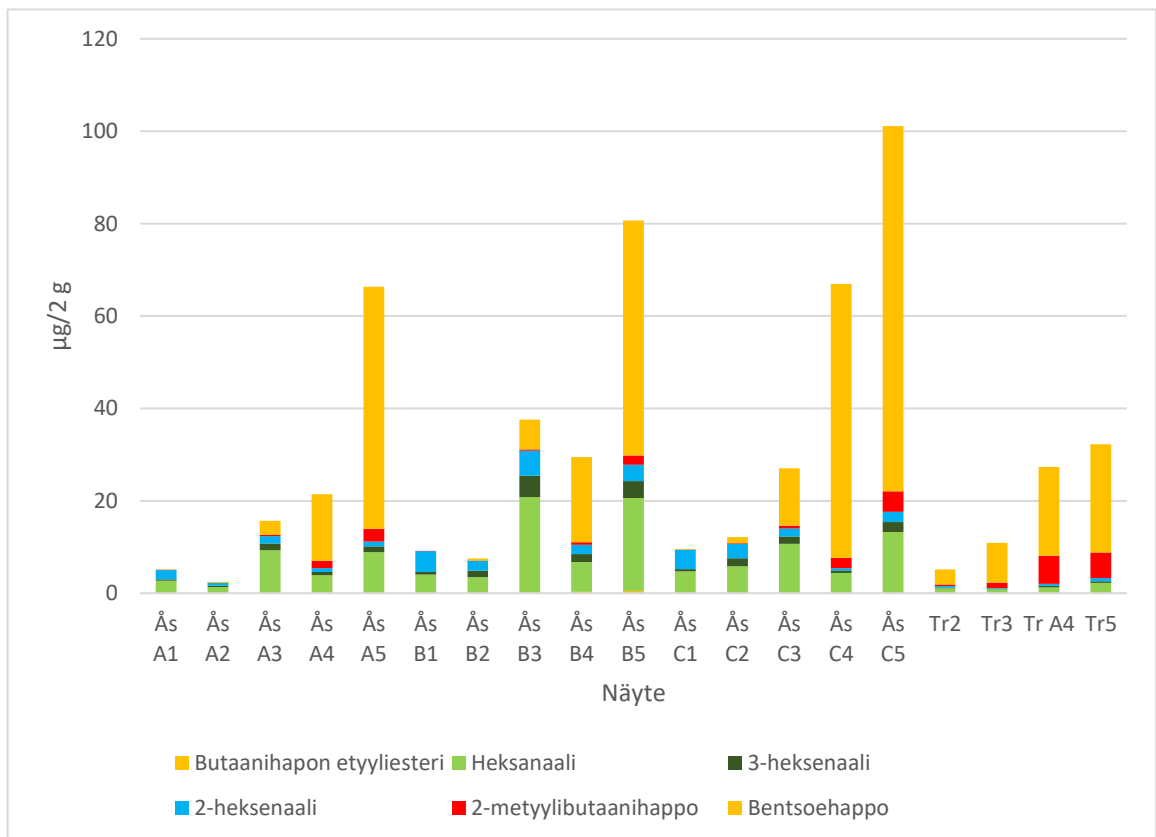
Miellyttävän tuoksuisia yhdisteitä, kuten asetofenonia löytyi enemmän kypsistä marjanäytteistä. D-limoneeni tunnistettiin kypsyysnäytteistä, mutta fytotroninäytteissä sitä esiintyi erittäin pienissä määrissä. Asetofenoni on miellyttävän makea, marsipaanin ja kumaariinin tuoksuinen ja D-limoneeni sitruksisen makea. Puolukan ominaisuudesta osittain vastaavaa 2-metyylivoihappoa tunnistettiin runsaimmissa määrin tummanpunaisista marjoista. Etenkin Tromssan marjat sisälsivät runsaasti tätä yhdistettä (KUVIO 7)



KUVIO 5. Haihtuvien yhdisteiden kokonaismäärä Ås:in ja Tromssan näytteissä Ås A1-5, Ås B1-5, Ås C1-5 ja Tr 2-5. Värit kuvastavat marjan kypsymisen edistymistä vihreänvalkoisesta raa'asta marjasta ylikypsäksi (tumman punainen). Kirjaimet A-C kuvaavat eri kasvupaikkoja paikkakuntien sisällä.



KUVIO 6. Haihtuvien yhdisteiden kokonaismäärä Ås:in ja Tromssan näytteissä Ås A1-5, Ås B1-5, Ås C1-5 ja Tr 2-5 lukuunottamatta bentsoehappoa. Värät kuvastavat marjan kypsymisen edistymistä vihreänvalkoisesta raa'asta marjasta (harmaa) ylikypsäksi (tumman punainen). Kirjaimet A-C kuvaavat eri kasvupaikkoja paikkakuntien sisällä.



KUVIO 7. Kypsyysasteen näytteistä tunnistetut suuripitoisimmat yhdisteet Åsasta Å1-5, Ås B1-5, Ås C1-5 ja Tromssasta Tr2-5. Kirjaimet A-C kuvaavat eri kasvupaikkoja paikkakuntien sisällä.

TAULUKKO 6. Kypsyysastenäytteet A. SPME/GC-MS:llä mitattujen puolukan haihtuvien yhdisteiden pitoisuudet (µl/2 g) näytteittäin.

Yhdiste	Äs A1	Äs A2	Äs A3	Äs A4	Äs A5	Äs B1	Äs B2	Äs B3	Äs B4	Äs B5
(E)-2-heksen-1-oli	0,033±0,038	0,014±0,004	0,025±0,006	0,026±0,009	0,071±0,033	0,139±0,046b	0,029±0,016	0,029±0,007	0,041±0,008	0,046±0,023
(E)-2-okten-1-oli	0,004±0,004	0,003±0,004	0,012±0,002b	0,008±0,001a	0,005±0,002	0,004±0,003	0,007±0	0,017±0,001b	0,011±0,003	0,028±0,007c
(E)-2-oktenaali	0,053±0,005b	0,021±0,003	0,069±0,009b	0,028±0,004	0,061±0,014b	0,069±0,011a	0,032±0,004a	0,078±0,003c	0,032±0,007a	0,06±0,005b
(E)-2-pentenaali	0,089±0,014b	0,033±0,003a	0,107±0,027c	0,061±0,02ab	0,087±0,023bc	0,155±0,007b	0,086±0,023a	0,271±0,042c	0,094±0,01a	0,28±0,013c
(E,E)-2,4-heksadienaali	0,025±0,004	0,017±0,001	0,061±0,013b	0,034±0,008	0,073±0,025b	0,047±0,009	0,047±0,01	0,17±0,026b	0,083±0,016	0,145±0,036b
(E,E)-2,4-heptadienaali	0,066±0,014c	0,021±0,002a	0,042±0,007b	0,025±0,005a	0,039±0,008b	0,112±0,019c	0,041±0,007a	0,077±0,004b	0,04±0,006a	0,076±0,005b
(Z)-3-heksenyyl-asettaatti	1,354±0,386b	0,194±0,047	0,316±0,072	0,256±0,126	0,146±0,034	1,226±0,332a	0,117±0,032	0,184±0,058	0,274±0,296	0,148±0,064
1-heksanoli	0,259±0,07b	0,094±0,017a	0,318±0,076b	0,303±0,099b	0,427±0,062c	0,276±0,056	0,148±0,072a	0,501±0,144b	0,346±0,114	0,45±0,191b
1-okten-3-oli	1,716±2,784	0,046±0,007	0,146±0,019	0,099±0,014	0,197±0,059	2,391±3,966b	0,073±0,006a	0,173±0,013	0,129±0,031a	0,425±0,22
1-pentanoli	0,174±0,025c	0,054±0,005a	0,137±0,018b	0,076±0,012a	0,113±0,026b	0,339±0,054c	0,141±0,015a	0,169±0,016b	0,087±0,016a	0,143±0,016ab
1-penten-3-oni	0,384±0,092c	0,161±0,023b	-	0,276±0,072b	0,469±0,109	0,642±0,029	0,392±0,095	1,154±0,068b	0,01±0,003a	1±0,568b
1-propanoli	-	-	-	-	-	0,005±0	0,005±0	-	-	0,023±0,018b
2-etyylifuraani	0,189±0,071c	0,04±0,006ab	0,016±0,002a	-	0,087±0,026b	0,366±0,05b	0,081±0,022	-	-	0,091±0,094
2-heksenaali	2,018±0,461c	0,626±0,071	1,625±0,452b	0,824±0,305	1,059±0,304ab	4,48±0,382ab	2,122±0,58	5,421±0,944c	1,991±0,241	3,557±0,808b
2-metyyli-3-buten-2-oli	-	-	-	0,009±0,009	0,009±0,01	-	-	0,128±0,079b	0,283±0,025c	-
2-metyyli-3-butanaali	0,02±0,003	0,015±0	0,005±0,003a	0,015±0,006	0,023±0,004	0,024±0,001	0,019±0,002	0,005±0,001a	0,019±0,007	0,015±0,005
2-metyylipropanaali	0,315±0,046c	0,169±0,016	0,203±0,022	-	0,165±0,025	0,324±0,053b	0,24±0,113b	-	-	-



Yhdiste	As A1	As A2	As A3	As A4	As A5	As B1	As B2	As B3	As B4	As B5
<b>2-metyylibutaanihappo</b>	0,044±0,009	0,016±0,022	0,23±0,073	1,629±0,831a	2,748±1,337b	0,021±0,012	0,045±0,005	0,264±0,064	0,552±0,139	1,999±0,524b
				b						
<b>3-heksenaali</b>	0,28±0,059	0,305±0,015	1,444±0,363b	0,697±0,259	1,212±0,387b	0,541±0,066a	1,409±0,358b	4,673±0,753d	1,708±0,236b	3,665±0,503c
<b>3-metyylibutanaali</b>	0,053±0,028b	0,006±0,007	0,052±0,023b	0,013±0,005	0,008±0,006	0,052±0,019	0,006±0,004	0,003±0,003	0,015±0,005	-
<b>6-metyyli-5-hepten-2-oni</b>	0,087±0,006c	0,028±0,002a	0,023±0,005a	0,019±0,004a	0,034±0,009b	0,145±0,017a	0,059±0,005	0,037±0,005	0,035±0,007	0,038±0,012
		b	b							
<b>Asetaldehydi</b>	0,28±0,069b	0,113±0,019	0,02±0,023	0,049±0,049	0,61±0,133c	0,292±0,083	0,137±0,039	-	0,044±0,045	0,363±0,303b
<b>Asetofenoni</b>	0,043±0,038	0,048±0,048	0,037±0,021	0,07±0,032	0,075±0,076	0,088±0,009	0,057±0,033a	0,033±0,006a	0,101±0,07	0,195±0,09b
<b>Asetoiini</b>	0,015±0,002c	0,006±0,001b	-	-	-	0,022±0,008a	0,009±0,005	-	-	-
<b>Bentsaldehydi</b>	0,035±0,003	0,022±0,001	0,052±0,016	0,037±0,011	0,1±0,099	0,034±0,004	0,039±0,003	0,054±0,005	0,044±0,015	0,103±0,04b
<b>Bentsoehapon metyyliesteri</b>	0,11±0,015	0,004±0,003	0,128±0,018	0,121±0,017	0,261±0,122b	0,069±0,006a	0,107±0,019	0,131±0,008	0,186±0,058	0,241±0,088c
<b>Bentsoehappo</b>	0,034±0,035	0,164±0,177	3,067±0,816	14,393±1,543	52,426±15,961	-	0,437±0,04	6,449±3,045	18,474±10,20	50,865±19,579
				b					2	b
<b>Bentsyylialkoholi</b>	0,114±0,014	0,1±0,097	0,258±0,102	0,198±0,017	1,294±1,537	0,077±0,011a	0,35±0,074	0,838±0,202	0,621±0,33	1,32±0,607c
<b>D-limoneeni</b>	0,02±0,001	0,013±0,006	0,012±0,001	0,013±0,005	0,012±0,001	0,023±0,002a	0,06±0,009ab	0,119±0,004b	0,13±0,018b	0,461±0,083c
<b>Dodekaanihapon metyyliesteri</b>	-	-	-	-	-	-	-	0,006±0,001	0,008±0,002b	0,003±0,006
<b>Etikkahappo</b>	0,068±0,005a	0,032±0,019a	0,072±0,019a	0,093±0,029b	0,072±0,02ab	0,115±0,029b	0,047±0,006a	0,09±0,02	0,058±0,015a	0,096±0,035
	b		b							
<b>Etyyliasettaatti</b>	0,217±0,034	0,17±0,006	0,007±0,002a	0,315±0,034c	0,208±0,024	0,27±0,035b	0,21±0,023	0,157±0,009a	0,244±0,026	0,196±0,01
<b>Eukalyptoli</b>	0,026±0,015	0,003±0,004	-	0,027±0,032	0,005±0,005	0,051±0,027	0,114±0,028	0,957±0,326	0,553±0,036	3,254±0,851b
<b>Fenetyylialkoholi</b>	0,003±0,001	0,002±0,002	0,002±0,001	0,003±0,001	0,006±0,005	0,003±0,004	0,001±0,001	0,004±0,001	0,003±0,002	0,003±0,002
<b>Heksaanihappo</b>	0,189±0,023	0,101±0,093	0,41±0,109ab	0,622±0,252b	0,663±0,309b	0,205±0,034a	0,363±0,082	0,531±0,134	0,671±0,165	0,858±0,307c
<b>Heksanaali</b>	2,723±0,718a	1,301±0,146a	9,3±0,152c	3,799±0,533b	8,884±1,835c	4,069±0,184	3,487±1,121	20,607±0,286	6,483±1,055	20,066±2,814b
	b							b		
<b>Heksyliasettaatti</b>	0,025±0,005a	0,006±0,002a	0,032±0,008a	0,051±0,027b	0,027±0,009ab	0,02±0,006	0,001±0,001	0,01±0,004	0,02±0,023	0,017±0,007
	b		b							

Yhdiste	Äs A1	Äs A2	Äs A3	Äs A4	Äs A5	Äs B1	Äs B2	Äs B3	Äs B4	Äs B5
<b>Heptaanihappo</b>	0,025±0,005	0,012±0,011	0,028±0,006	0,051±0,024	0,098±0,045b	0,028±0,005	0,037±0,005	0,039±0,012	0,08±0,028b	0,087±0,032b
<b>Kamfeeni</b>	0,005±0,003	0,002±0,003	0,002±0	0,001±0,001	0,004±0,001	0,008±0,002a	0,076±0,016c	0,163±0,026c	0,106±0,019b	0,189±0,036c
<b>Karyofylleeni</b>	0,026±0,027	0,002±0,001	0,001±0	0,015±0,025	0,001±0,001	0,011±0,007	-	0,592±1,021	0,819±0,82	0,004±0,001
<b>Nonaanihappo</b>	0,06±0,017	0,028±0,025	0,093±0,026a b	0,191±0,058b	0,547±0,118c	0,061±0,015	0,09±0,031	0,174±0,037	0,227±0,05	0,425±0,156b
<b>Nonanaali</b>	0,037±0,002b	0,013±0,003a	0,023±0,003a b	0,019±0,007a b	0,056±0,018c	0,042±0,003b	0,023±0,001	0,028±0,004	0,024±0,006	0,044±0,01b
<b>Oktaanihappo</b>	0,019±0,005	0,008±0,007	0,015±0,006	0,028±0,012	0,122±0,03b	0,021±0,005	0,027±0,008	0,025±0,005	0,051±0,019	0,066±0,028b
<b>Pentaanihappo</b>	0,042±0,006a b	0,001±0,001a	0,148±0,055c d	0,195±0,051d	0,094±0,048bc	0,037±0,009a	0,069±0,022	0,169±0,035b	0,139±0,042	0,191±0,108b
<b>p-symeeni</b>	-	0,008±0,011	0,002±0	0,012±0,016	0,008±0,006	0,013±0,023a	-	0,724±0,04b	0,58±0,044	1,068±0,635b
<b>Sitronelloni</b>	-	-	0,002±0	-	0,008±0,006b	-	-	-	0,003±0,002	0,002±0,002
<b>Terpineeni-4-oli</b>	0,005±0,002	0,005±0,003	0,002±0,001	0,029±0,049	0,004±0,001	0,046±0,013	0,003±0,001	3,044±1,191	3,078±0,155	3,102±3,082
<b>Voihapon etyyliesteri</b>	-	-	0,009±0,002	0,069±0,086	0,014±0,005	27,22±3,29	22,01±2,14	61,27±3,26	51,07±11,85	109,69±22,22
<b>α-Pineeni</b>	-	-	0,446±0,1b	0,025±0,025	0,031±0,024	-	-	2,338±0,276b	1,818±0,365b	2,073±1,308b
<b>β-Pineeni</b>	0,008±0,002	0,027±0,04	0,005±0,001	0,004±0,003	0,01±0,001	0,023±0,006	0,145±0,026	0,164±0,088	0,13±0,077	0,21±0,125
<b>γ-Terpineeni</b>	0,004±0,001	0,005±0,002	0,002±0	0,006±0,006	0,004±0,002	0,013±0,002a	0,182±0,026	0,258±0,017	0,243±0,14	0,521±0,101c
<b>Kokonaispitoisuus</b>	21,46±1,20	14,62±0,26	29,02±1,54	34,93±0,79	82,91±21,25	27,22±3,29	22,011±2,14	61,27±3,26	51,07±11,85	109,69±22,22

Kirjaimet b ja c tarkoittavat yhdisteiden keskiarvojen olevan eri ryhmissä ja eroavan tilastollisesti toisistaan. Tulokset, joista puuttuu kirjain (eli a-ryhmä) ovat omassa tilastollisessa ryhmässään. Taulukossa kirjaimet b, c ja d kertovat näytteen poikkeavan tilastollisesti muista näytesarjan näytteistä.

TAULUKKO 7. Kypsyysastenäytteet B. SPME/GC-MS:llä mitattujen puolukan haihtuvien yhdisteiden pitoisuudet (µl/2 g) näytteittäin.

Yhdiste	Äs C1	Äs C2	Äs C3	Äs C4	Äs C5	Tr2	Tr3	Tr A4	Tr5
Asetaldehydi	0,299±0,052	0,303±0,06	0,321±0,034	0,733±0,155b	0,479±0,287ab	0,166±0,021	0,235±0,061	-	0,202±0,065
2-metyylipropanaali	0,25±0,029	0,105±0,113	0,079±0,081	0,116±0,117	0,069±0,069	0,101±0,014	0,106±0,11	-	0,14±0,083
Etyyliasettaatti	0,269±0,018	0,212±0,024	0,253±0,013	0,377±0,032b	0,232±0,029	0,181±0,007a	0,417±0,048c	0,34±0,018	0,37±0,028
2-metyylibutanaali	0,025±0	0,02±0,001a	0,023±0,003	0,034±0,002b	0,024±0,012	0,016±0,001a	0,037±0,004	0,105±0,01c	0,034±0,003b
3-metyylibutanaatti	0,025±0,008b	0,015±0,01ab	0,07±0,016d	0,048±0,013c	-	0,019±0,003	0,031±0,009b	0,032±0,007b	0,016±0,003
2-etyylifuraani	0,32±0,077b	0,114±0,081	0,104±0,015	0,045±0,006	0,067±0,071	0,022±0,003	0,008±0,005ab	-	0,041±0,024b
α-Pineeni	-	0,012±0,01	0,009±0,005	-	0,086±0,041b	-	0,014±0,005	0,009±0,001	1,985±1,377b
1-penten-3-oni	0,417±0,086	0,399±0,09	0,447±0,055	0,278±0,056a	0,86±0,442b	0,167±0,009	0,214±0,049	0,137±0,03	0,316±0,051b
2-metyyli-3-buten-2-oli	-	-	0,019±0,006b	-	0,006±0,006	-	-	-	-
Voihapon etyyliesteri	0,002±0,002a	0,003±0,002a	0,019±0,006b	0,018±0,004b	0,009±0,005a	0,006±0,001	0,008±0,001	0,013±0,002b	0,008±0,001
Kamfeeni	0,008±0,008	0,001±0	0,001±0	0,002±0	0,005±0,003	-	-	-	0,137±0,065b
Heksanaali	4,693±1,607	5,8±1,111	10,65±1,878b	4,343±0,613	13,252±3,067b	1,048±0,078	0,873±0,144	1,271±0,402	2,224±0,135b
β-Pineeni	0,059±0,078	0,003±0,001	0,004±0,002	0,004±0,001	0,028±0,02	0,001±0	0,002±0,001	-	0,181±0,069b
(E)-2-pentenaali	0,114±0,017b	0,106±0,025b	0,074±0,013ab	0,039±0,007a	0,197±0,033c	0,023±0,002	0,028±0,006	0,028±0,006	0,04±0,004b
3-heksenaali	0,527±0,159	1,746±0,415b	1,64±0,232b	0,565±0,082	2,128±0,164b	0,163±0,028	0,093±0,021ab	0,299±0,162b	0,334±0,027b
D-limoneeni	0,017±0,003	0,013±0,002	0,012±0,001	0,01±0,001	0,02±0,008b	0,009±0,001	0,011±0,002	0,009±0,001	0,153±0,047b
3-metyyli-1-butanoli	-	-	-	-	0,009±0,007	0,006±0,004	-	-	0,105±0,106
Eukalyptoli	0,019±0,01	0,007±0,004	0,011±0,007	0,009±0,002	2,26±0,447b	0,006±0	0,008±0,005	0,008±0,005	0,748±0,183b
2-heksenaali	4,139±1,118c	3,105±0,911	1,719±0,385	0,512±0,062a	-	0,334±0,045ab	0,157±0,037	0,47±0,265b	0,719±0,063c
γ-Terpineeni	0,004±0	0,003±0	0,003±0	0,002±0	0,183±0,012c	0,002±0	0,002±0	0,002±0,001	0,159±0,045b
1-pentanoli	0,161±0,017	0,139±0,03b	0,121±0,018b	0,076±0,015a	0,034±0,043	0,042±0,006	0,055±0,003b	0,038±0,007	0,071±0,007c
p-symeeni	0,008±0,01	0,002±0,001	-	-	0,029±0,012	-	-	0,004±0,001	0,274±0,284
Heksyliasettaatti	0,036±0,003	0,033±0,02	0,029±0,007	0,046±0,018	-	0,023±0,011	0,02±0,025	0,143±0,117	0,353±0,121b
Asetoiini	0,01±0,006	0,014±0,009	0,027±0,028	-	0,291±0,123	0,013±0,003	-	-	0,03±0,03

Yhdiste	Ås C1	Ås C2	Ås C3	Ås C4	Ås C5	Tr2	Tr3	Tr A4	Tr5
<b>(Z)-3-heksenyyli asetaatti</b>	1,126±0,055c	0,611±0,203b	0,293±0,078	0,235±0,063	0,059±0,014b	0,236±0,095	0,173±0,218	1,08±1,192	1,263±0,269
<b>6-metyyli-5-hepten-2-oni</b>	0,079±0,01c	0,057±0,005b	0,022±0,003	0,021±0,002	0,744±0,173b	0,017±0,003	0,019±0,001	0,021±0,002	0,028±0,004b
<b>1-heksanoli</b>	0,432±0,119	0,277±0,044	0,621±0,078b	0,317±0,083	0,108±0,045b	0,082±0,026	0,111±0,107	0,558±0,384ab	0,937±0,314b
<b>Nonanaali</b>	0,036±0,003	0,024±0,002	0,027±0,006	0,029±0,007	0,103±0,024c	0,037±0,013	0,044±0,009	0,057±0,013	0,07±0,024
<b>(E,E)-2,4-heksadienaali</b>	0,047±0,012	0,085±0,016bc	0,06±0,012ab	0,042±0,009	0,196±0,092b	0,011±0,001ab	0,007±0,002	0,014±0,005b	0,017±0,002b
<b>(E)-2-heksen-1-oli</b>	0,186±0,072b	0,086±0,017	0,146±0,039	0,038±0,017	0,087±0,032b	0,015±0,009	0,02±0,015	0,235±0,173	0,185±0,102
<b>(E)-2-oktenaali</b>	0,049±0,009	0,031±0,003	0,035±0,006	0,03±0,003	0,379±0,091	0,022±0,001	0,028±0,003	0,02±0,005	0,024±0,002
<b>1-okten-3-oli</b>	2,682±4,447	0,098±0,003	0,177±0,019	0,158±0,017	0,059±0,016	0,042±0,005	0,045±0,004	0,047±0,008	0,064±0,005b
<b>Etikkahappo</b>	0,061±0,004	0,062±0,01	0,05±0,014	0,078±0,011	0,062±0,02b	0,024±0,026a	0,117±0,018	0,112±0,035	0,139±0,06
<b>(E,E)-2,4-heptadienaali</b>	0,098±0,011c	0,062±0,018b	0,026±0,004	0,025±0,002	0,187±0,132	0,015±0,002	0,019±0,001	0,017±0,002	0,027±0,002b
<b>Bentsaldehydi</b>	0,089±0,024	0,061±0,023	0,076±0,011	0,058±0,008	0,007±0,005	0,101±0,023	0,116±0,015	0,083±0,016	0,115±0,016
<b>Karyofylleeni</b>	0,016±0,01b	0,003±0,003	-	-	0,013±0,008b	0,001±0	0,001±0	0,001±0	0,001±0,001
<b>Terpineeni-4-oli</b>	0,006±0,001	0,002±0,001	0,001±0,001	0,002±0,001	0,023±0,004b	0,001±0	0,001±0,001	0,002±0,001	0,008±0,004b
<b>(E)-2-okten-1-oli</b>	0,004±0,002	0,006±0,003	0,02±0,003b	0,007±0,002	1,032±0,897	0,004±0,001	0,005±0	0,005±0,001	0,007±0,001b
<b>Bentsoehapon metyyliesteri</b>	0,12±0,024	0,119±0,029	0,124±0,028	0,187±0,013	0,57±0,205b	0,072±0,004	0,117±0,006b	0,088±0,014ab	0,102±0,023ab
<b>Asetofenoni</b>	0,076±0,007	0,068±0,038	0,158±0,09	0,462±0,057b	4,375±1,585c	0,057±0,016	0,126±0,082ab	0,24±0,096b	0,118±0,021ab
<b>2-metyylibutaanihappo</b>	0,08±0,016	0,164±0,026	0,616±0,395	2,21±0,22b	0,066±0,037	0,318±0,081	1,146±0,575	6,101±0,872b	5,544±1,482b
<b>Bentsoehapon etyyliesteri</b>	-	-	-	-	-	0,003±0,001	-	-	0,264±0,093b
<b>Pentaanihappo</b>	0,091±0,014	0,098±0,029	0,114±0,04	0,123±0,031	-	0,042±0,027	0,236±0,063c	0,132±0,085b	-
<b>Sitronelloni</b>	-	-	-	-	-	0,001±0,001	-	0,02±0,032	-
<b>Dodekaanihapon metyyliesteri</b>	0,003±0	-	0,004±0,006	0±0	0,624±0,334	-	-	-	-
<b>Heksaanihappo</b>	0,519±0,13	0,377±0,12	0,853±0,222	0,57±0,121	1,008±0,756b	0,199±0,073	0,79±0,307b	0,478±0,157ab	1,527±0,348c
<b>Bentsyylialkoholi</b>	0,023±0,004	0,288±0,119ab	0,188±0,054	0,309±0,05ab	0,007±0,003b	0,126±0,006	0,363±0,022	0,724±0,077b	0,66±0,28b
<b>Fenetyylialkoholi</b>	0,002±0,001	0,002±0	0,002±0	0,005±0,001ab	0,089±0,048	0,002±0,001	0,029±0,046	0,002±0	0,002±0,001
<b>Heptaanihappo</b>	0,03±0,009	0,036±0,017	0,099±0,054	0,089±0,019	0,139±0,05b	0,032±0,01	0,033±0,02	0,058±0,012	0,146±0,043b
<b>Oktaanihappo</b>	0,016±0,005	0,022±0,012	0,079±0,052ab	0,073±0,017ab	0,671±0,245b	0,041±0,025	0,036±0,018	0,043±0,008	0,084±0,032

Yhdiste	Ås C1	Ås C2	Ås C3	Ås C4	Ås C5	Tr2	Tr3	Tr A4	Tr5
<b>Nonaanihappo</b>	0,04±0,024	0,099±0,057	0,262±0,132	0,499±0,066b	79,081±14,483c	0,121±0,041	0,186±0,053	0,316±0,068b	0,331±0,087b
<b>Bentsoehappo</b>	0,142±0,031	1,299±0,671	12,398±10,556	59,307±2,759b	120,639±19,325	3,261±1,496	8,599±2,985ab	19,149±10,08bc	23,408±6,93c
<b>Kokonaispitoisuus</b>	27,606±4,505	26,261±2,67	42,167±12,356	82,337±2,703	120,639±19,325	17,375±1,979	25,014±2,473	42,834±10,173	53,926±9,957

Kirjaimet b ja c tarkoittavat yhdisteiden keskiarvojen olevan eri ryhmissä ja eroavan tilastollisesti toisistaan. Tulokset, joista puuttuu kirjain (eli a-ryhmä) ovat omassa tilastollisessa ryhmässään. Tilastollinen analyysi suoritettu kolmen näytteen sarjassa (Tr 9A-9C ja As Tr 15A-C).

## 4 Tulosten pohdinta

Marjan haihtuvien yhdisteiden pitoisuuksiin vaikuttavat olennaisesti marjan kypsyysaste: haihtuvien yhdisteiden kokonaiskonsentraatio kasvaa marjan kypsyessä. Lisäksi pitoisuuksiin vaikuttavat lajike, käsittely poiminnan jälkeen sekä kasvu- että säilytysolosuhteet. Muun muassa mansikassa haihtuvien yhdisteiden kokonaispitoisuus oli 100 kertaa suurempi täysin kypsissä punaisissa marjoissa kuin vaaleanpunaisissa tai vihreänvalkoisissa marjoissa. (Forney, 2001). Kypsymisen vaikutus haihtuvien yhdisteiden kokonaispitoisuuteen on esitetty kuvassa 5. Eniten vaihtelua kokonaispitoisuuksien välillä esiintyi raa'an valkoisessa marjassa näytteissä As B1 ja As C1 sekä raa'an vihreässä Tr2 marjassa.

Muun muassa Rusen ja muiden (2012) tutkimuksessa villikarpalo sisälsi runsaammin heksanaalia kuin viljelty variantti. Lisäksi kukkaisen tuoksuista  $\alpha$ -terpineolia esiintyi vähemmän villeissä kuin viljellyissä marjoissa. Fytotroninäytteistä käy ilmi, että kasvin fenotyyppi ja kasvupaikka vaikuttavat yhdisteiden muodostumiseen, sillä Åsin marjat sisälsivät huomattavasti enemmän vihreitä aldehydejä (heksanaali ja 2-heksenaali) kuin Tromssan marjat. Marjojen pakastamisella on myös osansa yhdisteiden muodostumisessa. Jungin ja muiden (2017) tutkimuksesta käy ilmi, että linoli- ja oleiinihapon hapettumisen myötä heksanaalin, dekanaalin ja nonanaalin pitoisuus nousi pakastuksen aikana. Tässä tutkimuksessa käytetyt marjat olivat pakastettuja.

Marsol-Vall ja muut (2018) osoittivat pohjoisemmalla leveyspiirillä kasvaneiden mustaherukoiden sisältävän runsaammin haihtuvia yhdisteitä kuin etelämmässä kasvaneet. Kuitenkin tässä tutkimuksessa tulokset ovat päinvastaiset. Kyse on eri lajista, mutta eteläisemmällä leveyspiirillä kasvaneissa puolukoissa haihtuvien yhdisteiden määrä oli keskimääräisesti suurempi. Bentsoehappoa löytyi runsaasti Tromssan 15 asteen fytotroninäytteistä, mikä nostaa haihtuvien yhdisteiden kokonaispitoisuutta melkoisesti.

2-metyylibutaanihappo osoittautui sekä Anjoun ja muiden (1967) että Viljakaisen ja muiden (2010) tutkimuksessa runsaspitoiseksi ja vahvasti puolukan

ominaistuoksuun vaikuttavaksi yhdisteeksi. Marjan kypsyessä tämän yhdisteen pitoisuus kasvoi kaksinkertaisesti. Tässä tutkimuksessa fytotroninäytteistä ei kuitenkaan tunnistettu 2-metyylibutaanihappoa. 2-metyylibutaanihappoa löytyi vaihtelevasti kypsyysastenäytteistä, runsaimmin sitä tunnistettiin punaisista ja tummanpunaisista marjoista.

## 5 Yhteenveto

Marjojen haihtuvien yhdisteiden tutkimus on keskittynyt muihin marjoihin kuin puolukkaan osaksi puolukan haastavien aistinvaraisten ominaisuuksien takia. Puolukka on kuitenkin ravitsemuksellisilta ominaisuuksiltaan yhtä hyvä kuin mustikka tai karpalo. Haihtuvien yhdisteiden kartoitus puolukasta auttaa ymmärtämään sen aistinvaraisia ominaisuuksia ja antaa mahdollisuuksia muokata niitä eri tarpeisiin.

Tutkimuksen tavoitteena oli kartoittaa puolukan haihtuvia yhdisteitä eri sijainnissa ja lämpötilassa kasvaneista sekä eri kypsyysasteen marjoista. 9 ja 15 asteessa kontrolloidussa kasvuympäristössä kasvaneita marjoja käytettiin selvittämään lämpötilan vaikutusta haihtuviin yhdisteisiin. Kypsyysasteen vaikutuksen tutkintaan tarkoitettuja näytteitä oli viittä eri luokkaa: raaka, vihertävä, punertava, kypsä ja ylikypsä.

Marjan kypsyysaste vaikutti erityisesti bentsoehapon määrään, mikä nousi huomattavasti marjan kypsymisen edetessä. Tämä osaltaan vaikutti myös marjojen kokonaishaihtuvien yhdisteiden pitoisuuden korkeuteen kypsissä ja ylikypsissä marjoissa. Lisäksi kypsyminen vaikutti marjan painoon: kypsät ja ylikypsät marjat olivat painavampia kuin vihreät ja punertavat. Lämpötilan vaikutus fytotroninäytteissä näkyi yksittäisissä haihtuvissa yhdisteissä, mutta Åssan näytteissä oli selkeästi enemmän vihreän tuoksuisia yhdisteitä.

Åssa ja Tromssassa kerätyt marjat esivalmisteltiin ja analysoitiin hyödyntäen SPME/GC-MS -menetelmää. Menetelmänä SPME-GC/MS on suoraviivainen ja näytteiden valmistelu on nopeaa sekä yksinkertaista. Se on myös herkkä ja kykenee tunnistamaan pieniäkin pitoisuuksia. Tähän tutkimustyöhön se sopi erittäin hyvin, sillä suuren näytemäärän käsittely oli nopeaa ja vaivatonta. Yhdisteiden kvantitointi ja tunnistaminen onnistui hyvin NIST:n referenssikirjaston avulla. Massaspektrometrin resoluutio oli myös riittävä samoihin aikoihin eluoituvien yhdisteiden tunnistamiseen toisistaan. Fytotroninäytteiden yhdisteiden tunnistuksen olisi voinut suorittaa tarkemmin, sillä siinä ei tullut otettua huomioon ihan pienimpiä retentiopiikkejä. Molempien näytekategorioiden kohdalla olisi pitänyt käyttää samanlaista piikin poissulkemiskriteeriä:



yhdistetäulukoista huomaa, että kypsyyssastenäytteissä on erittäin pieniä pitoisuuksia ja fytotroninäytteissä ei vähemmän.

Tutkimuksessa käytetty menetelmä SPME-GC/MS on toimiva, mutta sillä on rajoitteensa, kun halutaan kvantitatiivisia tuloksia. Puolukan haihtuvien yhdisteiden tutkimuksen kehittämisen kannalta olisi tärkeää pystyä määrittämään yhdisteiden pitoisuuksia tarkasti. Vasta tämän jälkeen voi miettiä puolukan tuoksulle ominaisia hallitsevia ja vähäisiä yhdisteitä. Näiden yhdisteiden tunnistaminen tarkoittaisi, että puolukan tuoksuprofiilia voitaisiin muokata ja näin kehittää yleisesti miellyttävämpään suuntaan. Tuoksuvat yhdisteet vaikuttavat myös koettuun makuaistimukseen, joten haihtuvien yhdisteiden kautta voidaan vaikuttaa myös makuun.

Tutkimus on onnistuneesti kartoittanut puolukan haihtuvia yhdisteitä ja niihin vaikuttavia tekijöitä. Mikäli puolukkaa halutaan viljellä, on näistä tuloksista hyötyä, kun halutaan lisätä tai laskea tietyn VOC:n pitoisuutta. Marjastaja saattaa myös hyötyä tämän tutkimuksen tuloksista, sillä marjoja voidaan kerätä tietynlaiselta kasvualueelta tietyn kypsyyssasteen. Marjan kypsyyssaste onkin hyvä ottaa huomioon, sillä kypsyminen lisää happaman bentsoehapon määrää. Kasvupaikan sijainti sekä fenotyyppi vaikuttaa olennaisesti marjan tuoksuprofiiliin. Kasvupaikan sijainnin valinnalla on tärkeä rooli puolukan miellyttävyyden kehittämisessä. Oleellista olisi kuitenkin selvittää, millä tavalla puolukassa esiintyvät haihtuvat yhdisteet vaikuttavat sen ominaisuuteen. Kuten johdannossa esiteltiin, yhdisteen suuri pitoisuus ei välttämättä tarkoita, että yhdiste myös tuoksuu voimakkaasti.

## 6 Lähteet

Alfaddagh, A., Martin, S., Leucker, T., Michos, E., Blaha, M., Lowenstein, C., Jones, S. & Toth, P. (2020) Inflammation and cardiovascular disease: From mechanisms to therapeutics. *American journal of preventive cardiology* **4**:100130.

Anjou, K., & Sydow, E. (1967) The Aroma of Cranberries. I. *Vaccinium vitis-idaea* L. *Acta Chemica Scandinavica*, **21**:945–952.

Beaulieu, J. & Lea, J. (2003) Volatile and quality changes in fresh-cut mangos prepared from firm-ripe and soft-ripe fruit, stored in clamshell containers and passive MAP. *Postharvest Biology and Technology* **30**(1):15–28.

Beaulieu, J., Stein-Chisholm, R. & Boykin, D. (2014) Qualitative Analysis of Volatiles in Rabbiteye Blueberry Cultivars at Various Maturities Using Rapid Solid-phase Microextraction. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **139**(2):167–177

Beema Shafreen, R., Dymerski, T., Namiesnik, J., Jastrezebski, Z., Vearasilp, S. & Gorinstein, S. (2017) Interaction of human serum albumin with volatiles and polyphenols from some berries. *Food Hydrocolloids*, **72**:297–303.

Berenbaum, M. R. (1995) The chemistry of defense: theory and practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**(1):2–8.

Brown, E., Nitecki, S., Pereira-Caro, G., Mcdougall, G., Stewart, D., Rowland, I., Crozier, A. & Gill, C. (2014) Comparison of in vivo and in vitro digestion on polyphenol composition in lingonberries: Potential impact on colonic health. *BioFactors* **40**(6):611–623

Brückner, B. & Wyllie, S. G. (2008) Fruit and vegetable flavour: recent advances and future prospects. p. 317.

Bujor, O., Ginies, C., Popa V. & Dufour C. (2018) Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. *Food Chemistry* **252**:356–365

Chmiel, T., Kupska, M., Wardencki, W. & Namiesnik, J. (2017) Application of response surface methodology to optimize solid-phase microextraction procedure for chromatographic determination of aroma-active monoterpenes in berries. *Food Chemistry* **221**:1041–1056

- Christensen, L. P. & Pedersen, H. L. (2006) Varietal differences in the aroma compound profile of blackcurrant berries. *Developments in Food Science* **43**(C):257–260
- Davidson, E., Zimmerman, B., Jungfer, E. & Chrubasik-Hausmann, S. (2014) Prevention of Urinary Tract Infections with Vaccinium Products. *Phytotherapy Research* **28**(3):465–470
- Du, X., Olmstead, J. & Rouseff, R. (2012) Comparison of Fast Gas Chromatography–Surface Acoustic Wave (FGC-SAW) Detection and GC-MS for Characterizing Blueberry Cultivars and Maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(20):5099–5106
- Du, X. & Rouseff, R. (2014) Aroma Active Volatiles in Four Southern Highbush Blueberry Cultivars Determined by Gas Chromatography–Olfactometry (GC-O) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(20):4537–4543
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. & Kaplan, I. (2013) Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* **198**(1):16–32
- Dymerski, T., Namiesnik, J., Vearasilp, K., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Weisz, M., Katrich, E. & Gorinstein, S. (2015) Comprehensive two-dimensional gas chromatography and three-dimensional fluorometry for detection of volatile and bioactive substances in some berries. *Talanta* **134**:460–467
- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Keller, A., Ulrich, D., Kroh, L. & Rohn, S. (2011) UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry* **126**(1):60–64
- Elmore, J. S. (2015) Aroma extract analysis, Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages. *Food Science, Technology and Nutrition* 408-417
- Fariña, L., Boido, E., Carrau, F., Versini, G. & Dellacassa, E. (2005) Terpene Compounds as Possible Precursors of 1,8-Cineole in Red Grapes and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(5):1633–1636
- Farneti, B., Khomenko, I., Grisenti, M., Ajelli, M., Betta, E., Algarra, A. A., Cappellin, L., Aprea, E., Gasperi, F., Biasioli, F. & Giongo, L. (2017) Exploring Blueberry Aroma Complexity by Chromatographic and Direct-Injection Spectrometric Techniques. *Frontiers in Plant Science* **0**:617
- Forney, C. F. (2001) Horticultural and other Factors Affecting Aroma Volatile Composition of Small Fruit. *HortTechnology* **11**(4):529–538

- Gilbert, J., Guthart, M., Gezan, S., Pisaroglo de Carvalho, M., Schwieterman, M., Colquhoun, T., Bartoshuk, L., Sims, C., Clark, D. & Olmstead, J. (2015) Identifying Breeding Priorities for Blueberry Flavor Using Biochemical, Sensory, and Genotype by Environment Analyses. *PLoS ONE* **10**(9)
- Harb, J., Bisharat, R. & Streif, J. (2008) Changes in volatile constituents of blackcurrants (*Ribes nigrum* L. cv. "Titania") following controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology* **47**(3):271–279
- Hasin-Brumshtein, Y., Lancet, D. & Olender, T. (2009) Human olfaction: from genomic variation to phenotypic diversity. *Trends in Genetics* **25**(4):178–184
- Hausch, B. J., Lorjaroenphon, Y. & Cadwallader, K. R. (2015) Flavor chemistry of lemon-lime carbonated beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**(1):112–119
- Hirvi, T. & Honkanen, E. (1983) The aroma of blueberries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **34**(9):992–996
- Hirvi, T., Honkanen, E. & Pyysalo, T. (1981) The aroma of cranberries. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 1981 172:5, **172**(5):365–367
- Hjalmarsson, I. & Ortiz, R. (2008) Effect of genotype and environment on vegetative and reproductive characteristics of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica*, **48**(4):255–262
- Horvat, R., Schlotzhauer, W., Chortyk, O. & Payne, J. (2011) Comparison of Volatile Compounds from Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*) and Deerberry (*V. stamineum*) during Maturation. *Journal of Essential Oil Research* **8**(6):645–648
- Hui, Y., Chen, F., Nollet, L., Guiné, R., Le Quéré, J., Martín-Belloso, O., Mínguez-Mosquera, M., Paliyath, G., Pessoa, F., Sidhu, J., Sinha, N. & Stanfield, P. (2010) Handbook of Fruit and Vegetable Flavors. *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors* 25-155
- Jung, K., Fastowski, O., Poplacean, I. & Engel, K. (2017) Analysis and Sensory Evaluation of Volatile Constituents of Fresh Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**(43):9475–9487
- Jung, K., Fastowski, O. & Engel, K.-H. (2016) Occurrence of 4-methoxy-2-methyl-2-butanethiol in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) berries. *Flavour and Fragrance Journal*, **31**(6):438–441

Klavins, L., Mezulis, M., Nikolajeva, V. & Klavins, M. (2021) Composition, sun protective and antimicrobial activity of lipophilic bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) extract fractions. *LWT*, **138**:110784

Knudsen, J., Tollsten, L. & Bergström, L. (1993) Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, **33**(2):253–280

Kowalska, K. (2021) Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Fruit as a Source of Bioactive Compounds with Health-Promoting Effects—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(10)

Laaksonen, O., Knaapila, A., Niva, T., Deegan, K. & Sandell, M. (2016) Sensory properties and consumer characteristics contributing to liking of berries. *Food Quality and Preference*, **53**:117–126

Lo, M. *et al.* (2004) Characterization of an Ultraviolet B-Induced Lipase in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **135**(2):947–958

Loreto, F., Taylor, C., Wang, L., Nowack, L., Wang, T. & Thompson, J. (2014) Volatile isoprenoids and their importance for protection against environmental constraints in the Mediterranean area. *Environmental and Experimental Botany*, **103**:99–106

Luo, M. *et al.* (2021) Insights into profiling of volatile ester and LOX-pathway related gene families accompanying post-harvest ripening of “Nanguo” pears. *Food Chemistry*, **335**:127665

Matthews, B., Wickland, R. & Bhar, D. (1970) Relationship of Stage of Ripeness to Composition and Keeping Quality Highbush Blueberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **95**(2):239–242

Mane, C., Loonis, M., Juhel, C., Dufour, C. & Malien-Aubert, C. (2011) Food Grade Lingonberry Extract: Polyphenolic Composition and In Vivo Protective Effect against Oxidative Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(7):3330–3339

Marsol-Vall, A., Kelanne, N., Nuutinen, A., Yang, B. & Laaksonen, O. (2021) Influence of enzymatic treatment on the chemical composition of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) juice. *Food Chemistry*, **339**:128052

Mazurek, B., Ryszko, U., Kostrzewa, D., Chmiel, M. & Kondracka, M. (2022) Brief characteristics of oxidative stability, fatty acids and metal content in selected berry seed extracts obtained by the SFE technique and used as potential source of nutrients. *Food Chemistry*, **367**:130752

- McDougall, G., Ross, H., Ikeji, M. & Stewart, D. (2008) Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Grown in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(9): 3016–3023
- Morales, M., Callejón, R., Ubeda, C., Guerreiro, A., Gago, C., Miguel, M. & Antunes, M. (2014) Effect of storage time at low temperature on the volatile compound composition of Sevillana and Maravilla raspberries. *Postharvest Biology and Technology*, **96**: 128–134
- Niimura, Y. (2012) Olfactory Receptor Multigene Family in Vertebrates: From the Viewpoint of Evolutionary Genomics. *Current Genomics*, **13**(2):103
- Nishida, N., Tamotsu, S., Nagata, N., Saito, C. & Sakai, A. (2005) Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, **31**(5):1187–1203
- Pagès-Hélary, S., Dujourdy, L. & Cayot, N. (2022) Flavor compounds in blackcurrant berries: Multivariate analysis of datasets obtained with natural variability and various experimental parameters. *LWT*, **153**:112425
- Pateraki, I. & Kanellis, A. K. (2010) Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Cell Reports*, **29**(6):629–641
- Penhallegon, R. (2006) Lingonberry Production Guide for the Pacific Northwest. *PNW 583-E*
- Pérez, A., Rios, J., Sanz, C. & Olías, J. (2002) Aroma components and free amino acids in strawberry variety Chandler during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**(11):2232–2235
- Pico, J., Gerbrandt, E. & Castellarin, S. (2022) Optimization and validation of a SPME-GC/MS method for the determination of volatile compounds, including enantiomeric analysis, in northern highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, **368**:130812
- Popescu, I., Codrici, E., Mihai, S., Lintraru, C., Neagu, M. & Tanase, C. (2021) *In vitro* assessment of the cytotoxicity and anti-inflammatory properties of a novel dietary supplement. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **22**(4):1–10
- Ribeaucourt, D., Bissaro, B., Lambert, F., Lafond, M. & Berrin, J. (2021) Biocatalytic oxidation of fatty alcohols into aldehydes for the flavors and fragrances industry. *Biotechnology Advances*, **1**:107787

- Sater, H., Bizzio, L., Tieman, D. & Muñoz, P. (2020) A Review of the Fruit Volatiles Found in Blueberry and Other Vaccinium Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **68**(21):5777–5786
- Singh, H., Batish, D., Kaur, S., Arora, K. & Kohli, R. (2006)  $\alpha$ -Pinene Inhibits Growth and Induces Oxidative Stress in Roots. *Annals of Botany*, **98**(6):1261–1269
- Small, D. (2012) Flavor is in the brain. *Physiology & Behavior*, **107**(4):540–552
- Tetali, S. (2019) Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta*, **249**(1):1–8
- The Good Scents Company, TGSC Information System 1980-2021 [sähköinen lähde] Viitattu 7.9.2022 <http://www.thegoodscentscopy.com/>
- Tholl, D. (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**(3):297–304
- Turtiainen, M., Salo, K. & Saastamoinen, O. (2011) Variations of yield and utilisation of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and cowberries (*V. vitis-idaea* L.) in Finland. *Silva Fennica*, **45**(2):237–251
- Uleberg, E., Rohloff, J., Jaakola, L., Tröst, K., Junttila, O., Häggman, H. & Martinussen, I. (2012) Effects of Temperature and Photoperiod on Yield and Chemical Composition of Northern and Southern Clones of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**(42):10406–10414
- Vavoura, M., Badeka, A., Kontakos, S. & Kontominas, M. (2015) Characterization of Four Popular Sweet Cherry Cultivars Grown in Greece by Volatile Compound and Physicochemical Data Analysis and Sensory Evaluation. *Molecules* **20**(2):1922–1940
- Viljakainen, S., Visti, A. & Laakso, S. (2010) Concentrations of Organic Acids and Soluble Sugars in Juices from Nordic Berries. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil and Plant Science* **52**(2):101–109
- Viljanen, K., Heiniö, R-L., Juvonen, R., Kössö, T. & Puupponen-Pimiä, R. (2014) Relation of sensory perception with chemical composition of bioprocessed lingonberry. *Food Chemistry*, **157**:148–156
- Vilkickyte, G., Motiekaityte, V., Vainoriene, R. & Raudone, L. (2022) Promising cultivars and intraspecific taxa of lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea* L.): Profiling of phenolics and triterpenoids. *Journal of Food Composition and Analysis* **114**:104796

Wang, L., Peng, A. & Proctor, A. (1990) Varietal difference in lipid content and fatty acid composition of highbush blueberries. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **67**(8):499–502

Yahya, A., Anderson, W. & Moo-Young, M. (1998) Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, **23**(7–8):438–450

Yamashita, I., Ino, K., Nemoto, Y. & Yoshikawa, S. (1977) Studies on flavor development in strawberries. 4. Biosynthesis of volatile alcohol and esters from aldehyde during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **25**(5):1165–1168

Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z. & Yu, X. (2020) Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Natural Product Communications* **15**(3):1–13

Zhang, Z., Zhou, Q., Huangfu, G., Wu, Y. & Zhang, J. (2019) Anthocyanin extracts of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) attenuate serum lipids and cholesterol metabolism in HCD-induced hypercholesterolaemic male mice. *International Journal of Food Science & Technology*, **54**(5):1576–1587

Zhu, J., Chen, F., Wang, L., Niu, Y., Chen, H., Wang, H. & Xiao, Z. (2016) Characterization of the Key Aroma Volatile Compounds in Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) Using Gas Chromatography– Olfactometry (GC-O) and Odor Activity Value (OAV). *J. Agric. Food Chem* **64**:24:4990–4999