

**Matala-alkoholisten fermentoitujen suomalaisten  
mansikoiden (*Fragaria x ananassa*)  
prosessoinnin vaikutus aromiaktiivisiin  
yhdisteisiin ja aistiominaisuuksiin**

Elintarvikekemian  
pro gradu -tutkielma

Laatija:  
Roni Tähti  
4.5.2023  
Turku

TURUN YLIOPISTO  
Bioteknologian laitos  
RONI TÄHTI

Matala-alkoholisten fermentoitujen suomalaisten mansikoiden (*Fragaria x ananassa*) prosessoinnin vaikutus aromiaktiivisiin yhdisteisiin ja aistiominaisuuksiin  
Maisteritutkimus, 55 sivua.

Elintarvikekemian

Toukokuu 2023

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

---

Tämän pro gradu - tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää kolmen mansikkalajikkeen sekä kahden hiivalajikkeen fermentoinnin vaikutus matala-alkoholisen juoman kemiallisiin ja aistittaviin ominaisuuksiin. Mansikka on suosittu kotimainen marja, jolla on jo useita käyttökohteita ja näin halutaan laajentaa näiden tuotteiden määrää. Vähäisellä prosessoinnilla ja paikallisilla marjoilla on kysyntää juomateollisuudessa ja halutaan tutkia mahdollisia käyttökohteita juomanvalmistuksessa.

Matala-alkoholiset juomat valmistettiin Luonnonvarainkeskukselta saaduista mansikkalajikkeista (n=6) käyttäen *Saccharomyces Cerevisiae* ja *Torulaspota delbrueckii*-hiivoja. Käymisessä muodostuneita yhdisteitä analysoitiin GC-FID:llä (kaasukromatografia-liekkionisaatiodektoilla), haihtuvia yhdisteitä HS-SPME-GC-MS:llä (ilmatilakiinteäfaasiuutto kaasukromatografi-massaspektrometria) ja aistinvaraisia ominaisuuksia koulutetulla raadilla (n=10) aistittavan laadun laboratoriossa. Raadille järjestettiin kolme arviointikoulutuskertaa ja kolme aistinvaraista arviointia. Tuloksissa vertailtiin ulkonäköä, hajua ja makuja.

Tuloksissa Honeoye-lajike oli sopivuudeltaan ominaisuuksien perusteella. Sillä oli korkein happamuus, punaisuus, värin voimakkuus ja läpinäkyvyys. Hiivoista *T. delbrueckii* fermentoi paremmin kuin *S. cerevisiae* käyttäessä pienempää määrää etanolia ja hiilidioksidia. *T. delbrueckii* loi myös mielekkäämmän maku- ja väri profiilin *S. cerevisiae* hiivaan verrattaessa.

**Avainsanat:** Mansikka, *fragaria x ananassa*, hiiva, aistinvarainen

# Sisällysluettelo

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Mansikasta yleisesti</b>	<b>5</b>
2.1	Mansikan laatu	7
2.2	Mansikan alkuperä	7
2.3	Mansikan kasvu	8
2.4	Mansikan rakenne	9
2.5	Fytokemikaalit	10
2.5.1	Polyfenolit	10
2.5.2	Antosyaanit	11
2.5.3	Mansikan värit	15
2.5.4	Muut fenoliset yhdisteet	16
2.6	Ellagitanniinit	17
2.7	Antioksidatiivinen kyky	21
<b>3</b>	<b>Mansikka yhdisteet</b>	<b>22</b>
3.1	Mansikan aromit	23
<b>4</b>	<b>Mansikat ja terveys</b>	<b>27</b>
4.1	Tulehdusta estävät ominaisuudet	29
4.2	Sydän- ja verisuonitaudit	29
4.3	Syöpä	29
4.4	Antimikrobinen kyky	30
<b>5</b>	<b>Fermentointi hiivat</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>Materiaalit ja menetelmät</b>	<b>34</b>
6.1	Tavoite	34
6.2	Mansikkalajikkeet, hiivat ja mehujen valmistus	34
6.3	Fermentointi	34
6.4	Sokeri ja happo analyysi	35
6.5	Aistinvarainen arviointi	36

	2
6.6 GC-MS	39
7 Tulokset ja niiden tarkastelu	40
7.1 Aisitinvarainen arviointi	41
7.2 Pääkomponenttianalyysi	42
7.3 Sokeri ja happo kaasukromatografia	43
7.4 Haihtuvien yhdisteiden GC-MS	44
8 Yhteenveto	50
Lähteet	51

# 1 Johdanto

Mansikka (*Fragaria* × *ananassa*) on arvostettu marja ympäri maailmaa. Mansikkaa pidetään korkealaatuisena ravinnonlähteenä ja monien tärkeiden ravintoaineiden lähteenä. Mansikka on helposti vahingoittuva ja pilaantuva marja, mutta on silti monen lempimarja sen makean ja miellyttävän maun takia (Hakala, 2002).

Mansikalla on monia satoja eri lajikkeita, joista tähän tutkimukseen on valittu lajikkeet Polka, Honeoye ja Lumotar. Polka on hollantilaisperäinen lajike, joka jalostettiin vuonna 1988, Honeoye on Pohjois-Amerikasta vuonna 1979 jalostettu, ja Lumotar on Luonnoinvarainkeskuksen itse jalostama. Mansikan laatuun vaikuttavat erilaiset asiat ennen ja jälkeen keräystä (Hakala, 2002).

Suomessa mansikkaa kasvatetaan yli 4 000 hehtaarilla ja vuonna 2018 mansikoita kerättiin 15 miljoonaa kiloa (LUKE 2018) ja vuonna 2019 kerättiin yli 17750 tonnia mansikkaa (LUKE 2019). Sen suuren saatavuuden ja miellyttävän maun vuoksi on syytä tutkia mansikoiden fermentointia matala-alkoholilliseksi juomiksi. Juomat säilyvät pidempään ja mansikkahävikki vähenee, valmistus työllistää ihmisiä ja lisää mansikoiden arvoa raaka-aineena. Matala-alkoholisten juomien kysyntä on nousussa ja kuluttajat haluavat niitä lisääntyneen terveystarkkailun vuoksi. Matala-alkoholisilla juomilla voi olla myös matalampi verotus kuin perinteisillä viineillä.

Mansikat ovat terveellisiä ja sisältävät paljon tarvittavia mikro- ja makroravintoaineita. Ne sisältävät myös paljon sokeria ja ovat siksi hyvä lähtöaine alkoholin valmistukseen. Työssä käytettiin kolmea eri lajiketta kahdella eri hiivalla (*Torulaspora delbrueckii* ja *Saccharomyces cerevisiae*). Valmistetut juomat analysoitiin aistinvaraisesti koulutettujen panelistien kanssa.

Juomat myös analysoitiin FID:illä (*engl. Flame ionization detector*) ja HS-SPME-GC-MS (*engl. Headspace solid-phase microextraction gas chromatography – mass spectrometry*) kromatografialla. Saatuja tuloksia verrattiin kirjallisuuteen.

Termi 'viini' tarkoittaa viinimarjoista tehtyä alkoholijuomaa. Vähäisen marja-alkoholitutkimuksen takia myös fermentoiduista marjajuomista voidaan fermentoida marjaviiniä. Marjaviinin termiä käytetään, kun viini valmistetaan muista kuin viinimarjoista.

Taulukko 1 Mansikan ravintoarvot (Giampieri ym 2012)

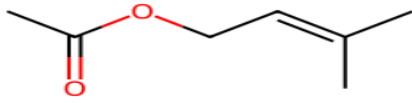
Ravintoaineet	Nimi	Per 100 g		Nimi	Per 100 g
	Vesi	90,95	Vitamiinit	C-vitamiini	58,8
	Energia (kcal)	32		Tiamiini (mg)	0,024
	Proteiini	0,67		Riboflaviini (mg)	0,022
	Tuhka	0,4		Niasiini (mg)	0,386
	Lipidit	0,3		Pantoteenihappo (mg)	0,125
	Ravintokuitu	2		Vitamiini B6 (mg)	0,047
	Hiilihydraatit	7,68		Folaatti (µg)	24
	Sokeri	4,89		Koliini (mg)	5,7
	Sakkarosi	0,47		Vitamiini B12 (µg)	0
	Glukosi	1,99		Vitamiini A (µg)	1
	Fruktoosi	2,44		Luteiini ja zeaksantiini (mg)	26
<b>Mineraalit</b>	Kalsium (mg)	16		Vitamiini E (mg)	0,29
	Rauta (mg)	0,41		Vitamiini K (µg)	2,2
	Magnesium (mg)	13			
	Fosfori (mg)	24			
	Kalium (mg)	153			
	Natrium (mg)	1			
	Sinkki (mg)	0,14			
	Kupari (mg)	0,048			
	Mangaani (mg)	0,386			
	Seleeni (µg)	0,4			

## 2 Mansikasta yleisesti

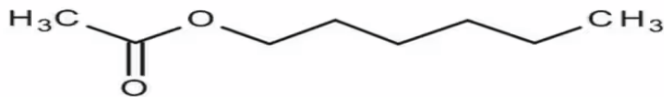
Mansikan laatuun vaikuttavat useat tekijät, mutta ne voidaan jakaa viiteen osa-alueeseen: Turvallisuus, maku, haju, ulkonäkö ja ravintoarvot. Nämä osa-alueet ovat lähellä toisiaan ja niitä kaikkia tarvitaan hyvän mansikan tunnistamiseksi. Mansikka ei ole kasvitieteellisten määritysten mukaan marja, vaan epähedelmä. Hedelmällä tarkoitetaan sikiämisestä kasvavaa solukkoa, kun taas epähedelmä voi muodostua paistuneesta kukkapohjuksesta.

Chwietermanin ja kumppanien tutkimuksessa käytettiin 54 eri mansikkanäytettä (35 lajiketta, 12 keräystä, 2 vuodenaikaa) ja huomattiin makeudella, maulla ja tekstuurilla olevan voimakas yhteys nauttimiseen. Happamuudella ei ollut yhteyttä mansikasta pitämiseen. Korkea kiinteys lisää tekstuurista pitämiseen, jolla on taas merkittävä yhteys yleiseen nauttimiseen. Makeudella oli suurin vaikutus mansikan pitämisen (Schwiterman ym 2014).

Edellä mainitun lisäksi huomattiin myös, että mansikat, joilla oli eniten ja vähiten aistittavaa makeutta olivat yleisesti paras ja huonoin mansikkalajike. Toiseksi tärkein ominaisuus oli haihtuvien yhdisteiden määrä. Tämä ei ole yllätys, sillä mansikan maulla oli suurin vaikutus mansikan kokonaisvaltaiseen miellyttävyyteen (Schwiterman ym 2014). Tutkimuksessa löydettiin myös kuusi volatiiliä, eli haihtuvaa yhdistettä, jotka vahvistavat makeuden tuntua ja kolme yhdistettä, jotka vähensivät makeuden tuntua. Näitä makuja vahvistavia yhdisteitä olivat heksyyliasettaatti-butaanihappo (*engl. butanoic acid, hexyl ester*), heksyyliasettaatti-asettaatihappo (kuva 2.) (*engl. Acetic acid, hexyl ester*), pentyylibutyraatti (*engl. butanoic acid, pentyl ester*), 1-penteeni-3-aani (*engl. 1-penten-3-one*), 2(3H)-furanoni-dihydro-5-oktyyli (*engl. 2(3H)-furanone, dihydro-5-octyl-*) ja 1-metyylibutyli-butaanihappo-esteri (*engl. butanoic acid, 1-methylbutyl ester*). Makeutta heikentäviä yhdisteitä olivat etyylioktanoaatti (*engl. octanoic acid, ethyl ester*), metyyli-isobutyliketoni (*engl. 2-pentanone, 4-methyl*) ja 2-buteeni-1-hydroksyyli-3-metyyliasettaatti (kuva 1.) (*engl. 2-buten-1-ol, 3-methyl-, 1-acetate*) (Schwiterman ym 2014)



Kuva 1 2-buteeni-1-hydroksyyli-3-metyyliasettaatti (engl. 2-buten-1-ol, 3-methyl-, 1-acetate)



Kuva 2 Asetaattihappo-heksyyliasettaatti (engl. Acetic acid, hexyl ester)

Mansikan punainen väri on antosyaanista johtuvaa. Antosyaanit ovat flavonoideja, jotka antavat kasveille värin. Mansikan pääasialliset antosyaanit ovat pelargonidiini 3-glukosidi (82 %), pelargonidiini 3-rutinosidi (9 %) ja syanidiini 3-glukosidi (9 %) ja tekstuurin väri voi vaihdella happojen takia (Hakala, 2000).

Mansikalla on lyhyt säilyvyysaika keräyksen jälkeen sen suuren metabolisen aktiivisuuden ja korkean nestemäärän takia. Tämä korkea nestemäärä nopeuttaa mikrobien ja hiivojen kasvua mansikoiden pinnalla. Tutkimuksessa huomattiin matalan lämpötilan pidentävän säilyvyyttä merkittävästi. 10 °C mansikat olivat hyviä kuusi päivää ja 0 °C olivat jopa 13 päivää kokeen alusta. Veden menetys oli suurin syy laadun heikkenemiselle (Ayala-Zavala J., ym 2004).

Bakteerien kasvu hidastui 5 °C:ssa 13 päivän ajan. 0 °C lämpötila hidastaa kasvua vielä enemmän. Mansikoiden yleinen bakteeriperäinentauti on *Botrytis cinerea*. Se voi tarttua kukkiin ja levitä välittömästi tai jäädä odottamaan marjan kypsymistä. Tauti voi odottaa, kunnes marja on kypsempi ja enemmän sokeria ennen puhkeamista (Ayala-Zavala J., ym 2004).

Usein kuiva-aineet ovat hiilihydraatteja kuten sokereita ja niiden suuri väheneminen voidaan selittää mansikan hengittämisellä. Jo 1990 tiedettiin hyvän mansikan sisältävän paljon sokeria ja melko paljon happoa (Kader 1990.) Liukenevien kuiva-aineiden määrä oli matalimmillaan 10 °C:ssa 10 päivän jälkeen, myös 5°C oli laskua mutta vähemmän.

Lämpötilalla ja ajalla oli merkittävä vaikutus mansikoiden liukenevien kuiva-aineiden määrään.

## 2.1 Mansikan laatu

Mansikka on monipuolinen ravintoaineiden lähde. Se sisältää ravintokuitua ja reilusti fruktoosia, jotka hidastavat verensokerin muutoksia ja näin lisäävät kylläisyyden tunnetta. 100 g mansikkaa sisältää vain 32 kcal ja niiden makea maun ansiosta ovat oiva välipala (Giampieri ym 2013).

Mansikan siemenöljy sisältävää paljon monitydyttymättömiä rasvahappoja (72 %). Mansikka on hyvä C vitamiinin (58,8 mg / 100 g) ja folaattien (24 mg / 100 g) tärkeä lähde ja yksi parhaista mikroravintoaineiden lähteistä. Mansikassa on myös muita vitamiineja kuten A (1 mg), E (~ 0,4 mg), K (2,2 mg) ja tiamiini (B1) (0,024 mg), riboflaviini (B2) (0,022 mg) ja niakiini (B3) (0,386 mg) (Giampieri ym 2012).

Mansikka sisältää monia mineraaleja, erityisesti mangaania ja kahdeksan keskikokoista marjaa eli noin 144 g riittää täyttämään 20 % päivittäisestä tarpeesta. Sama määrä mansikkaa riittää myös saavuttamaan ison osan päivittäisestä kaliumista tarpeesta. Mansikat ovat myös hyvä lähde magnesiumille, kuparille, raudalle, fosforille ja jodille. On hyvä huomata mansikan myös sisältävän ravintoaineiden lisäksi monia ei-ravintoaineita, kuten fenoleita ja fytokeemikaaleja (Giampieri ym 2012).

Esterit ovat yksi suurimmista haihtuvista yhdisteryhmistä. Yli 130 erilaista esterä on tunnistettu mansikasta. Ne muodostavat 25–90 % osan mansikan haihtuvista yhdisteistä. Haju on tärkeä ominaisuus laadun tarkastelussa (Du ym. 2011).

Sokereiden sijaintia mansikassa tutkittiin ja todettiin sokereita, kuten glukoosia, fruktoosia ja sakkaroosia olevan kaikkialla, mutta enemmän löytyi lähellä keskusosaa. Sakkaroosia löytyi mansikan yläosasta ja oli  $1,4 \pm 0,1$  kertaa korkeampi kuin kannan lähellä (Enomoto H., ym 2018).

## 2.2 Mansikan alkuperä

Mansikoiden jalostukseen voidaan käyttää perinteisiä tai moderneja jalostustapaa. Perinteisessä tavassa halutut yksilöt risteytetään ja näiden jälkeläiset kasvatetaan ja tutkitaan, onko haluttuja ominaisuuksia saavutettu. Tätä tapaa on käytetty jo ennen

ajanlaskua. Modernissa jalostuksessa haluttuja geenejä siirretään lajikkeiden ja lajien välillä geeniteknologian avulla.

Ennen Amerikan mansikoiden saapumista oli Euroopassa 3 päälajiketta: *Fragaria vesca*, *viridis* ja *moschata*. Nykyaikainen *Fragaria x ananassa* on kehitetty Ranskassa 1750-luvulla risteyttämällä *Fragaria virginiana* ja *Fragaria chiloensis*. Suomessa on 14 yleistä mansikkalajiketta: Polka, Honeoye, Sonata, Korona, Florence, Bounty, Zefyr, Senga Sengana, Kent, Jonsok, Tamella, Hiku, Ostara ja Malviina.

Jalostukseen voi olla monia syitä, kuten taudinkestävyys, parempi maku tai säilyvyys. Mansikoilla haluttuja ominaisuuksia ovat miellyttävä ulkonäkö, säänkestävyys ja marjankiinteys. Suomessa Luke on tehnyt tutkimusta jalostuksesta, jossa suomalaisia tunnettuja lajikkeita risteytettiin lajikkeisiin, jotka kestivät harmaahometta ja tyvimätää. Myös ominaisuudet kuten pensaan kasvu, marjan muoto, maku ja väri olivat haluttuja ominaisuuksia.

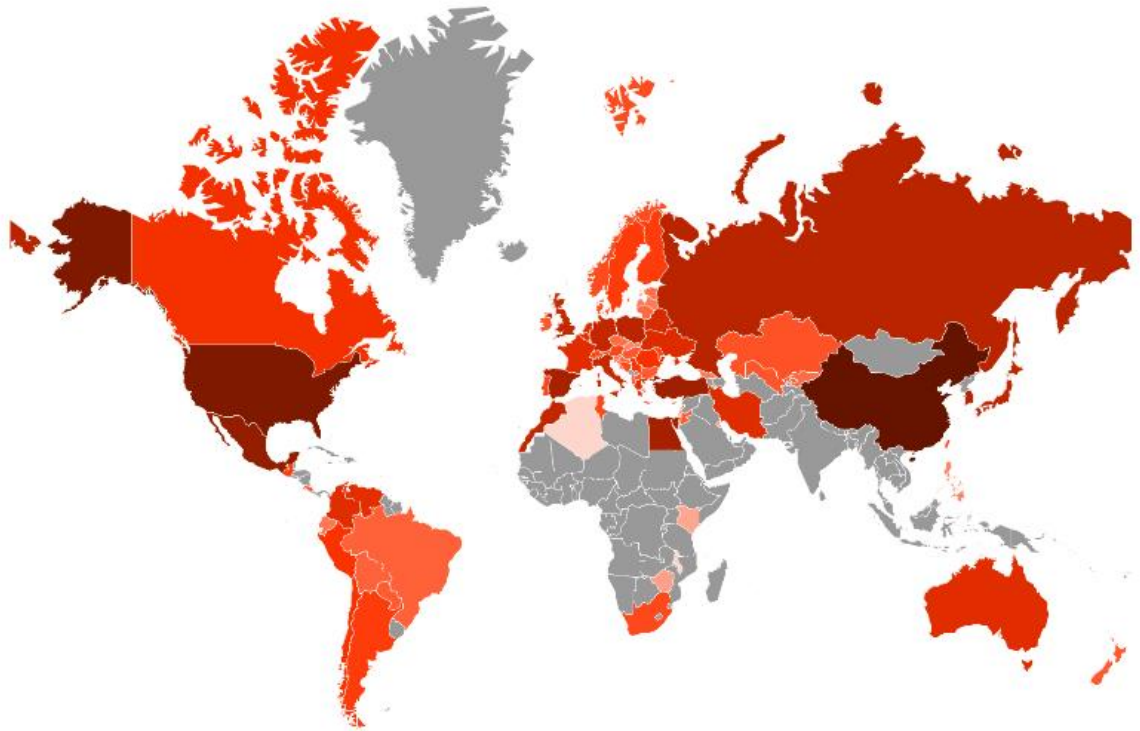
Mansikoita on saatavilla maantieteellisesti ja taloudellisesti kaikkialla, jonka takia ne ovat erittäin tutkittuja marjoja. Mansikoita voidaan syödä sellaisenaan tai niistä voidaan valmistaa erilaisia tuotteita kuten mehuja, juomia tai hilloja. Perinteisesti hyvä taudinkestävyys, pitkä säilyvyys, korkea saanto ja marjojen koko ja muoto ovat tärkeitä mansikkalajikkeissa. Mansikan sekundaariset yhdisteet ovat terveyttä edistäviä, mutta usein karvaita ja astringoivia, eivätkä ole kuluttajan mukaan haluttuja makuja. Tämän vuoksi on haastavaa jalostaa mansikkalajike, joka olisi terveellinen, kuluttajien mielestä hyvänmakuinen ja ei olisi herkkä taudeille.

Mansikan genotyypillä on suora yhteys niiden ravinnolliseen laatuun, antioksidatiiviseen kykyyn ja antosyaanien määrään. Viime aikoina mansikkalajikkeita on yhdistelty villoihin mansikkalajikkeisiin parantamaan lajikkeiden ominaisuuksia. Mansikoiden yhdisteet vaihtelevat myös merkittävästi eri asioiden takia, kuten iän, geneettisen perimän, keräystavan, säilytystavan ja ympäristön vaikutuksesta (Afrin ym 2016).

### **2.3 Mansikan kasvu**

Mansikka kasvaa jokaisella mantereella, mutta sen viljely on selvästi keskittynyt pohjoiselle pallonpuoliskolle. Suurimpia mansikan tuottajamaita ovat Kiina ja Yhdysvallat. Meksiko, Egypti ja Turkki ovat myös merkittäviä mansikan viljelijöitä (Kuva 3.). Afrikassa vain muutama valtio tuottaa mansikkaa. Ennen keräystä mansikan

laatuun vaikuttaa ilmasto, ympäristö, lajike ja kypsyyt. Keräyksen jälkeen asiat kuten, pakkaus, käsittely ja itse mansikoiden keräystapa



Kuva 3 Mansikoiden tuotto. Mitä punaisempi sitä enemmän tuottaa mansikkaa  
<https://www.atlasbig.com/images/World-Strawberry-Production-Map.png> haettu 4.1.2021

Vuonna 2000 tehdyssä tutkimuksessa seurattiin lehtien, juurien, lehtikannan ja marjojen kasvua eri päivä- ja yölämpötiloissa. Optimaalinen lämpötila lehtien ja lehtikantojen kasvuun oli 25/12 °C päivä/yö kun taas juurille ja marjoille 18/12 °C. Koko kasvin kasvulle paras lämpötila oli myös 25/12 °C. Nostettaessa lämpötila 30/22 °C kasvu hidastui. Tämän epäiltiin johtuvan vähenevistä kasvin toiminnoista kuten soluaineenvaihdunnasta, fotosynteesin heikkenemisestä ja muista lämmönnostosta johtuvista syistä (Wang ja Camp 2000).

## 2.4 Mansikan rakenne

Mansikka on monivuotinen rönsykasvi, joka kasvattaa ruohonvartisia kasveja ja lehdet kasvavat ruusukkeina. Kukat kasvavat hedelmöittymisen jälkeen marjoiksi, joita mansikoiksi kutsutaan. Mansikka on tieteelliseltä määritelmältään epähedelmä, sillä sen kukka osa paisuu hedelmäksi eikä muodostu sikiämisestä. Mansikat lisääntyvät siemenillä ja rönsyillä. Nykyinen mansikka (*Fragaria x ananassa*) on saatu risteyttämällä

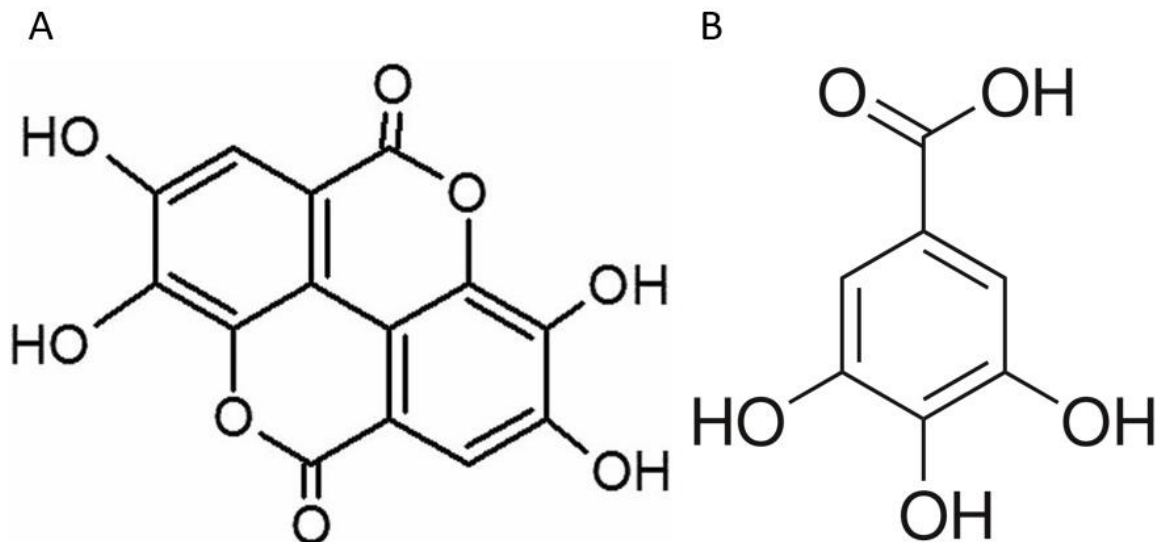
*Fragaria virginiana* ja *Fragaria chiloensis*. Mansikka ei kasvitieteellisessä mielessä ole marja, sillä syötävä marjaosa on sen kukkapohjus, ja pinnassa olevat ”siemenet” ovat oikea hedelmä.

## 2.5 Fytokemikaalit

Fytokemikaalit ovat iso ryhmä eri fenolisia yhdisteitä, joilla ei ole välttämättömiä toimintoja kasveissa, niillä on paljon eri hyödyllisiä ominaisuuksia ihmisille. Fenolisiin yhdisteisiin kuuluu flavonoideja, jotka ovat pääsääntöisesti antosyaanit. Flavonolit ja flavanolita ovat pieni osa fytokemikaaleja. Kaikki ellagitanniinit löytyvät mansikasta eli hydrolysoituvat tanniinit, fenoliset hapot ja kondensoidut tanniinit (Giampieri ym 2012).

### 2.5.1 Polyfenolit

Polyfenolit ovat yhdisteitä, joilla enemmän kuin yksi fenoliryhmä. Polyfenolit voidaan jakaa kahteen ryhmään: hydrolysoituvat tanniinit ja fenyylipropanoidit. Yleisimpiä mansikan polyfenoleita ovat flavonoidit, ellagitanniinit, flavonolit, flavanolit ja fenolihapot, kuten ellagihappo ja gallushappo (kuva 4). Näillä yhdisteillä on antioksidatiivisuutta lisääviä, verenpainetta alentavia, tulehdusta estäviä ja syövän kasvua heikentäviä ominaisuuksia.

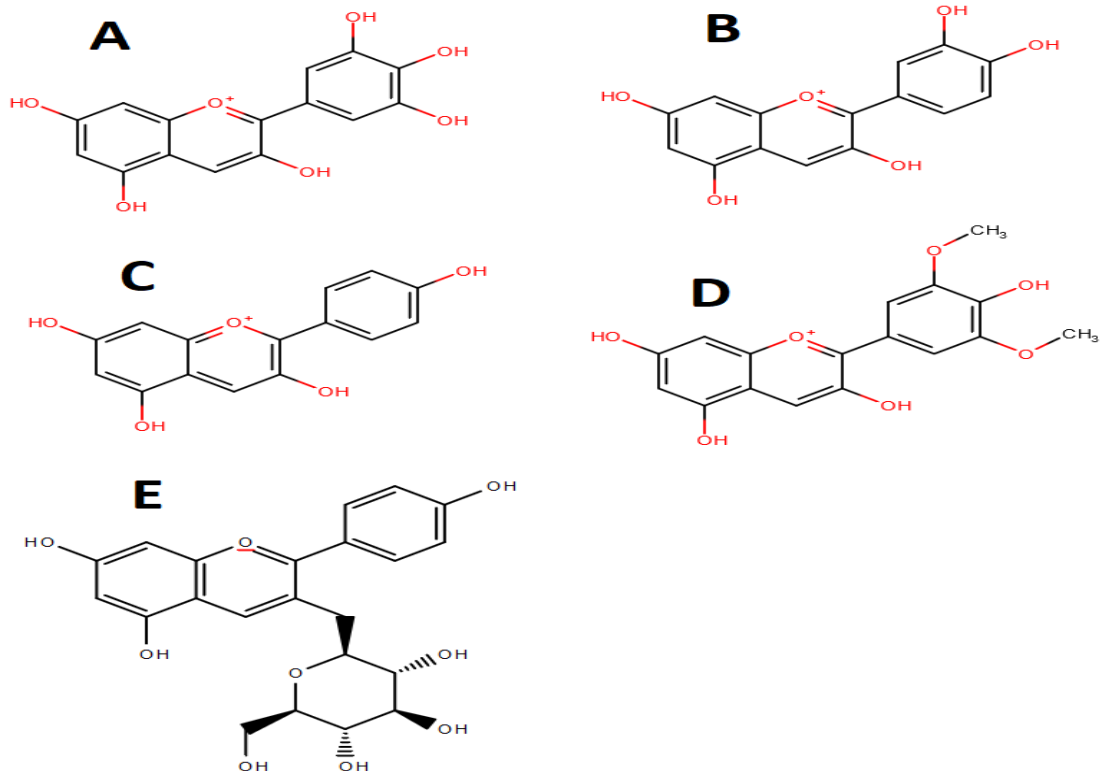


Kuva 4 A: Ellagihappo B: Gallushappo

## 2.5.2 Antosyaanit

Antosyaanit ovat yhdisteryhmä, jotka antavat kasveille punaisen, purppuran ja sinisen värit. Antosyaanit kuuluvat flavonoideihin, jotka taas kuuluvat polyfenoleihin. Antosyaanit ovat reagoivia yhdisteitä, jotka hajoavat tai reagoivat muiden yhdisteiden kanssa ruskeaksi tai värittömäksi aineeksi. Mansikan yleisimpiä antosyaaneja ovat syanidiini, delfinidiini, malvidiini, pelargonidiini (kuva 5.) Yleisiä asioita, joiden kanssa antosyaanit reagoivat ovat happi, korkea lämpötila, valo ja pH. Myös monet entsyymit reagoivat antosyaanien kanssa ja näin vaikuttavat mansikan värin häviämiseen ja heikkenemiseen. Antosyaaneilla on kahdeksan erilaista rakennetta vedessä pH:n vaihtelun perusteella, joista flavylium kationi yleisin alle 2 pH:ssa (McGhie ja Walton 2007). Antosyaanit ovat erittäin herkkiä ja reagoivat muutoksiin nopeasti ja voimakkaasti. Tämän vuoksi elintarvikkeiden valmistuksessa, tuotteen kuljetus ja matka suoliston läpi altistavat antosyaanit eri pH:lle ja vaihteleville lämpötiloille vaikuttaen näin niiden bioaktiivisuuteen. Tämä vaikeuttaa niiden terveysvaikutusten ymmärtämistä (McGhie ja Walton 2007).

Bioosaatavuus kuvaa aineiden imeytyvyyttä ruuansulatuselimistössä. Kyseistä määritelmää voidaan tarkentaa lisäämällä aineenvaihdunta, käytön, ulostamisen ja ravintoaineen tehokkuuden vaikutus mukaan. Ravintoaineen tehokkuudella tarkoitetaan aineita, jotka halutaan saada suoliostoon sellaisenaan, mutta voivat reagoida mahassa ei toivotulla tavalla (McGhie ja Walton 2007).



Kuva 5 A: Delfinidiini (violetti/sininen), B: Syanidiini (oranssipunainen), C: Pelargonidiini (siniharmaa/sinipunainen), D: Malvidiini (violetti), E: Pelargonidiini-3-glukosidi

Antosyaanien biosynteesi alkaa samasta yhdisteestä, dihydrokaempferolista. Dihydrokaempferolista muodostuu pelargonidiinia ensin reagoimalla dyhydroflavonol 4-reduktaasin ja sitten antysyaani syntaasin kanssa. Dihydrokaempferol muutetaan dihydrokversetiiniksi ja dihydromyrisetiiniksi flavonoidi 3'-hydroxylaasin ja flavonoidi 3',5'-hydroksylaasin avulla. Nämä yhdisteet reagoivat syanidiiniksi dihydroflavonoli 4-reduktaasin avulla ja delphinidiiniksi antosyaani syntaasin kanssa (Enomoto H., ym 2018).

Eläinkokeissa huomattiin antosyaanien imeytyvän glyksoidin muodossa ja siirtyvän verenkiertoon 15–120 min aikana. Rotille syötettiin *Vaccinium myrtillus* antosyaaneja, jotka nähtiin 15 minuutin sisällä ja laskivat nopeasti seuraavan kahden tunnin kuluessa (Morazzoni ym 1991). Toisessa tutkimuksessa mustaherukan antosyaanit imeytyivät suoraan vereen ja erittyivät glykosyloiduissa muodoissa, kun annettiin puhdasta delphinidiini-3-O-rutinosiidiä, syanidiini-3-O-rutinosiidiä ja cyanidiini-3-O-B-glukosiidiä. Virstassa ei nähty muita yhdisteitä tai piikkejä (Matsumoto ym 2001). Vaikka taulukossa

pelargonidiini-3-glukoosia on eniten Polka-lajikkeessa, oli sitä kuitenkin melkein kaksinkertaisesti enemmän kuin muita antosyaaneja (Yang ym 2021).

*Taulukko 2 Mansikkalajien antosyaanit*

Lajike	Työssä käytettyjen mansikkalajikkeiden tyypillisiä antosyaaniyhdisteitä	Ominaisuudet
Honeoye	Pelargonidiini-3-glukoosi, syanidiini-3-malonyyloglukoosi	Pohjois-Amerikka, marjat suuria ja tasakokoisia, kovapintaisia ja kestävät kuljetusta, hieman hapan ja mehukas
Polka	Syanidiini-3-glukoosi, pelargonidiini-3-malonyyloglukoosi	Hollantilainen, punaisia, kiinteä rakenne, raikkaan makea, vähäarominen. Toimivat hyvin pakaste- ja syömismarjoina.
Lumotar	Pelargonidiini-3-rutinoosi	Suomalainen, enemmän makea kuin hapan, suuri marjakoko kauden aluksi ja pienenee loppukautta kohden, taudinkestävyys hyvä

Eri mansikkalajikkeilla on erilainen antosyaanikoostumus. Mansikan väriin vaikuttavia antosyaaneja on löydetty yli 25 erilaista. Antosyaaneja löytyi mansikasta keskimäärin 150–600 mg / kg mutta niitä voi olla jopa 800 mg / kg kohti tuorepainosta (Garcia-Viguera ym 1998.) Glukoosi on yleisin korvike antosyaaneille, mutta rhamnosiini, arabinosiia ja rutinoosi ovat myös mahdollisia korvike (Giampieri ym 2012). Tutkimuksessa huomattiin antosyaanien määrän putoavan alas, kun mansikoista valmistetaan hilloa. (Kähkönen ym 2001). Toisessa tutkimuksessa tutkittiin suomalaisten mansikoiden antosyaani määriä. Mansikoista löydettiin syanidiinia (1,2–5 mg / 100 g kuivapainoa) ja pelargonidiinia (29,4–51 mg / 100 g kuivapainoa) kohti. Myös 2004 vuoden Honeoye-lajikkeella oli merkittävästi suurempi antosyaanimäärä kuin Polka-lajikkeesta ( $p < 0,001$ ), mutta Jonsokilla määrä ei eronnut Polka- tai Honeoye-lajikkeista (Koponen ym 2007).

Eräässä tutkimuksessa mitattiin mansikan antosyaanien imeytymistä. Koehenkilöille syötettiin 200 g mansikkaa aamupalan kera, joka sisälsi 179 µmol pelargonidiini-3-glukosidia. Vain pieni osa syödystä pelargonidiini-3-glukosidista tuli ulos sellaisenaan ja 83 % eritettiin pelargonidiini monoglukoronidina. 2/3 syödyistä pelargoniidi-3-glukosiidi johdannaisista tuli ulos ensimmäisen 5 tunnin aikana, mutta niiden eritysvirtsassa jatkui tutkimuksen loppuun saakka (Felgines, ym 2003).

Eräässä tutkimuksessa tarkasteltiin 27 eri mansikkalajiketta HPLC-DAD-MS spektrometrialla. Lajikkeilla Marlate ja Carisma oli antosyaaneja merkittävästi muita vähemmän, 8,5 ja 11,3 mg / 100 g kuivapainoa kohti. Toisaalta Rondolla ja Babettella oli merkittävästi enemmän 66 mg ja 64 mg / 100 g kuivapainoa kohti. Muilla mansikoilla se vaihteli 21–49 mg / 100 g kohti ja keskiarvona 34 mg / 100 g kuivapainoa kohti. Pelargonidiini-3-glukosiidi on yleisin antosyaani kaikilla tutkituilla lajikkeilla. Se vastasi 60–95 % kokonaismäärästä. Pelargonidiini-3-malonyylyglukosiidi oli toiseksi yleisin 0–33,5 % määrillä (Aaby ym 2012). Japanilaisessa tutkimuksessa pelargonidiini-3-malonyylyglukoosia ei valmistunut 9 lajikkeessa ja 11 lajikkeessa 5–24 %. Tämä voi johtua siitä, että sen valmistaminen on geneettistä (Yoshida, Koyama, & Tamura 2002)

Mansikoiden antosyaani määriä seurattiin myös kypsyiden mukaan kolmena eri kypsyysasteena. Melkein kypsä, kypsä ja erittäin kypsä olivat kolme luokkaa. Antosyaanien määrät olivat 1,8–3,3 kertaa korkeammat erittäin punaisilla marjoilla verrattuna osittain punaisiin marjoihin (Aaby ym 2012).

Patras ja muut tutkivat mansikoiden antosyaani määriä korkeapaineprosessoinnilla (engl. *Hydrostatic pressure processing*), huomattiin antosyaani määrien laskevan lämpöprosessoinnilla merkittävästi verrattuna alkuperäiseen ei-prosessoituu (27,9 % lasku). Korkeapaineprosessoiduilla ja ei-prosessoiduilla ei ollut antosyaani määrissä eroja (Patras ym 2009).

Japanilainen tutkimusryhmä, Enomoto H. ja muut 2018, käyttivät uutta teknologiaa IMS (engl. *Imaging mass spectrometry*), jolla voidaan samanaikaisesti tutkia mansikan yhdisteitä ja niiden sijoittumista mansikassa. He käyttivät paikallisia Tochiotome mansikkalajiketta. Laite ei tarvitse antibodeja, värjäämistä tai monimutkaisia prosesseja ennen analysointia. IMS voidaan yhdistää vähän ionisoivien tekniikoiden kanssa. Tällaisia ovat MALDI (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) ja DESI (engl. *Desorption electrospray ionization*). Näytteen päälle ruiskutetaan Matrix yhdistettä, joka

auttaa näytteen desorptiossa ja ionisoinnissa. Ruiskutusta on vaikea kontrolloida ja siksi näytteet vaihtelevat labrojen välillä suuresti (Enomoto, ym 2018).

Eräässä tutkimuksessa tutkittiin eri antosyaanien jakautumista mansikassa. Tutkimus näytti eri antosyaanien jakautuvan eri alueille. Pelargonidiineja löytyi eniten pinnalta, ytimeistä ja hedelmälihasta. Syanidiinia ja delphinidiinia taas mansikan pinnalta. Edellä mainittujen antosyaanien aglykoni johdannaisia löydettiin myös, ja niillä oli samanlainen jakauma kuin glykoneilla. Tämä kertoo sijainnin johtuvan enemmän antosyaanista, kuin sokerista (Enomoto, ym 2018).

Mansikan pinnassa olevat siemenet, pähkylät, vaihtavat väriä ja keräävät antosyaaneja kasvun aikana. Pähkylöistä löydettiin pelargonidinin glykosideja ja syanidiinin glykosideja ja delphinidin glykosiidiä pinnasta ja kannasta. Kannassa ja pähkylöiden välisessä pinnassa oli melkein sama määrä syanidiini glykosidia, mutta pelargonidiini glykosidia oli selvästi vähemmän pähkylöiden välisessä pinnassa. Tämä kertoi antosyaanien muodostuvan eri tavoin (Enomoto, ym 2018).

### 2.5.3 Mansikan värit

Mansikan värit vaihtelevat raan vihreästä kirkkaan punaiseen ja kypsään. Mansikoiden värit ovat pelargonidiinin ja syanidiinin johdannaisia aglykoneja. Mansikan väriä voidaan tutkia mittamalla sen aallonpituuksia spektrofotometrillä. Tutkimuksessa värisävy saatiin vertaamalla  $A_{420\text{nm}}/A_{520\text{nm}}$  ja voimakkuus laskemalla yhteen  $A_{420\text{nm}} + A_{520\text{nm}} + A_{620\text{nm}}$  (Wei Yang ym 2021).

Tutkimuksessa käytettiin CIELAB parametrejä värin määrittämiseen. Parametrit  $L^*$ ,  $a^*$  ja  $b^*$ , jotka kuvastavat valo-pimeys ( $L^*$ ), punainen-vihreä ( $a^*$ ) ja keltainen-sininen ( $b^*$ ). Näiden avulla saadut aloitus- ja lopetusarvot vähentämällä toisistaan ja laskemalla  $[(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2]^{1/2}$  yhtälöllä saadaan värimuutos ( $\Delta E$ ) selville. Yleisesti kun muutos on yli  $\Delta E > 3$  voidaan ero huomata (Wending ym 2023).

Tutkimuksessaan da Silvia ja muut löysivät 25 antosyaani pigmenttiä näytteistä, jossa käytettiin aallonpituutta  $\sim 500$  nm ja massaspektrometridataa käyttämällä voitiin tunnistaa antosyaanit. Tutkitut mansikkalajikkeet olivat Camarosa, Carisma, Eris, Oso Frande ja Tudnew. He löysivät myös muita pienempiä yhdisteitä, mutta niillä ei ollut tarpeeksi selkeää absorptiota tai massaspektraa, jotta ne voitaisiin tunnistaa (da Silva, ym 2007).

Pelargonidiini-3-glukosiidi (kuva 5) on yleisin antosyaaniyhdiste mansikkauutteissa, sitä seurasi pelargonidiini-3-rutinoosa ja syaani-3-glukosiidi. Nämä kolme yhdistettä olivat yli 95 % kokonaisantosyaanimäärästä mansikoissa. Kaikilla tutkituilla mansikkalajikkeilla, pelargonidiini oli yleisin aglykoni, mutta syanidiiniä löytyi myös. Glukosiidi oli yleisin korvike, mutta myös rutinoosia, arabinoosia ja rhamnoosia on löydetty. Yhdisteitä on myös asyloitu erillisillä alipaattisilla hapoilla, kuten omenahapolla, malonihapolla, meripihkahapolla ja etikkahapolla (da Silva, ym 2007).

Mansikan värin muutoksilla ei ollut eroja lämpötilojen välillä (0 °C, 5 °C, 10 °C), mutta löydettiin merkittävää eroa säilöntäpituuksien vaikutuksesta väriin. Kuitenkin antosyaanimäärässä huomattiin merkittäviä eroja säilytysaikojen välillä (Ayala-Zavala, ym 2004). Toisessa tutkimuksessa todettiin korkeampien kasvulämpötilojen nopeuttavan värin kehitystä verrattaessa mataliin lämpötiloihin (Wang ja Camp 2000). On myös huomattu mansikan sisäosan ja ulko-osan värien vaihtelevan lajikkeiden välillä. Huomattiin Aromas ja Diamante lajikkeiden olevan sisältä valkoisia ja Selva olevan vaaleanpunainen (Pelayo ym 2003).

Lämpötila vaikuttaa myös mansikan värien voimakkuuteen. Yö- ja päivälämpötilojen noustessa värit tummenivat. Marjat olivat punaisempia, sekä pinnan ja marjan sisällön värierot olivat suurempia (Wang ja Camp 2000).

Punainen väri on kuluttajalle tärkeää mansikan ominaisuus. Väri muodostuu antosyaanien yhteisvaikutuksen ansiosta. Pelargonidiini on oranssi/ruskea, delphinidiini on sininen/violetti ja syanidiini magenta/punainen. Näitä kaikkia löydettiin mansikan pinnalta tasaisesti ja mansikan sisältä pääsääntöisesti pelargonidiineja. Pelargonidiini glykosiidit ja syaniidin glykosiidit muodostuvat vasta kypsymisen yhteydessä vaihtaen värin punaisesta tummanpunaiseksi (Enomoto, ym 2018).

#### 2.5.4 Muut fenoliset yhdisteet

Mansikka sisältää myös fenolisia yhdisteitä kuten kversetiiniä ja kemferolia. Tutkimuksessa niitä oli 0,7–6,7 mg / 100 g kuivapainoa kohtaan.

Kversitiini-3-glukurondi oli yleisin flavonoli yhdiste, myös kemferoli-3-glukurondia ja kemferoli asetyyli-glukosidia löytyi mansikoista (Buendia ym 2010).

(+) -katekiinin konsentraatio laski Blink lajikkeissa, mutta pysyi samana Polka ja Senga Sengana lajikkeilla. Agrimonin määrässä ei ollut muutoksia erittäin punaisten mansikoiden Polkan, Senga Senganan ja Blinkin välillä. Sillä ei myöskään ollut suuria eroja muidenkaan lajikkeiden välillä. Koumaryyli-heksoosin määrä oli 1,6–3,5-kertainen erittäin punaisten ja osittain punaisten mansikoiden välillä. Samaa nähtiin cinnamoyyli glukoosin kanssa, niiden erot olivat 3,4–5,3-kertaa kypsimmässä ja raa'aimmissa marjoissa (Aaby ym 2012).

Proantosyanidiinien määrä laskee huomattavasti mansikan kypsyessä. Genotyyppi ja lajike vaikuttavat merkittävästi proantosyanidiinien määrään. Eniten proantosyanidiineja oli Darselect x Honeoye-lajikkeella, josta näitä yhdisteitä löytyi noin 2,5-kertaa enemmän kuin vähiten proantosyanidiineja sisältäneestä (Karina x Primella) x (Midway x Holiday)-lajikkeesta (Schaart ym 2013).

## 2.6 Ellagitanniinit

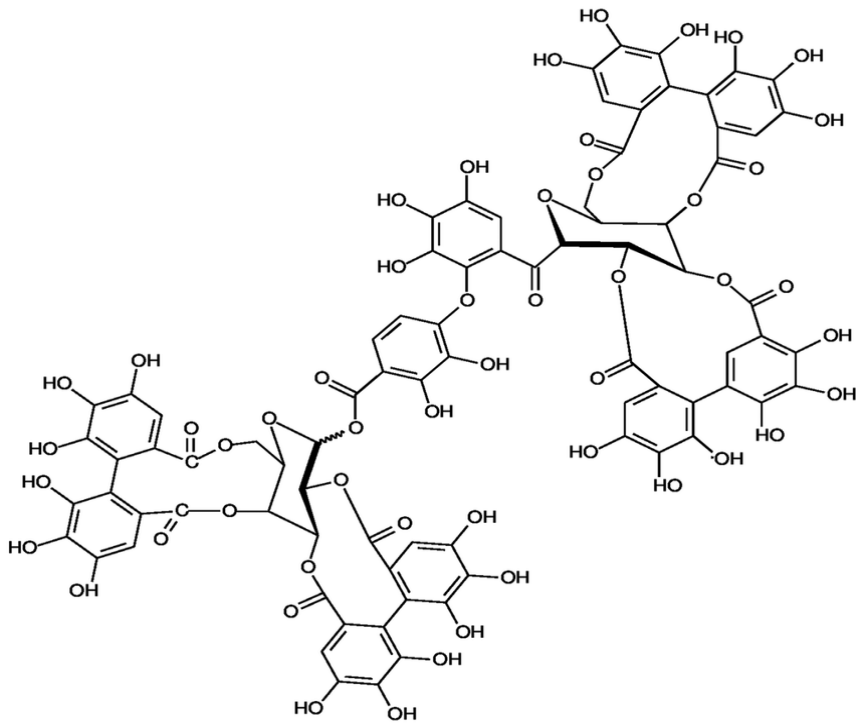
Ellagitanniinit ovat tanniineja. Tanniinit ovat polymeerisiä fenoliyhdisteitä, jotka sitovat ja saostavat proteiineja. Tanniineilla on proantosyaaniidien kanssa samanlaisia ominaisuuksia. Ellagitanniinit saostavat proteiineja ja alkaloideja sekä ovat painavia vesiliukoisia yhdisteitä. Ellagitanniinit ovat heksahydrofenolihappojen (HHDP) ja polyolien kuten kviinihapon tai glukoosin yhdistelmiä (Clifford M., 2000). Ellagitanniinien koko vaihtelee monomeereistä polymeereihin. Ellagitanniinien maitohapettumista ellagihapoksi (kuva 4 A) käytetään niiden tunnistamiseen ja löytämiseen. Ellagitanniinit ovat usein kasvien lääkeosuus, mutta ruokien ellagitanniinit ovat paljolti tuntemattomia ja vähän tutkittuja (Mattila ja Kumpulainen, 2002). Muiden tutkimusten mukaan mansikoissa on ellagitanniineja 68,3–85,3 mg / 100 g tuoretta mansikkaa kohti (Giampieri ym 2012) tai 0,4–0,6 mg / g kuivapainoa kohti (Clifford, 2000). Valmistettaessa hilloa ellagitanniinien määrä oli 23–36 % prosessoimattomiin marjoihin verrattaessa. Huomattiin myös mansikkahillossa olevan enemmän ellagihappoja kuin vadelmahillossa. Tutkimuksen perusteella mansikoiden ellagitanniinit ovat helposti hajoavia ja muuttuvan helposti ellagihapoksi. Ellagitanniinien määrässä ei nähty eroja lajikkeiden ja vuodenaikojen välillä (Koponen, ym 2007).

Ellagihappojen ensimmäinen imeytyminen tapahtuu vatsassa. Toiset ellagitanniinit imeytyvät vasta ohutsuolessa, kun ovat hydrolysoituneet hapoiksi neutraalissa pH:ssa.

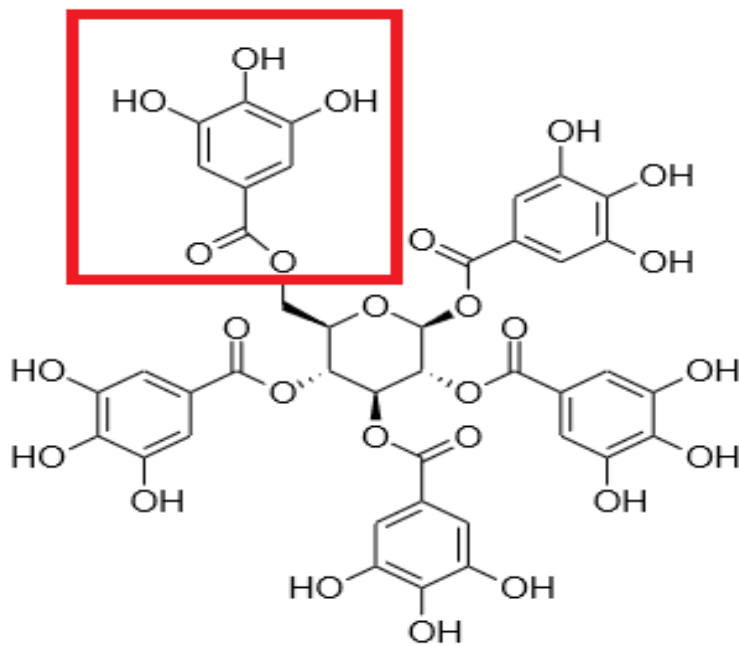
Suurin osa ellagitanniineista ja –hapoista transformoidaan mikrobiston toimesta suoliston lumenissa (engl. *intestinal lumen*) ellagijohdannaiseksi nimeltä urolithineiksi. Ellagitanniineja on viime vuosina alettu tutkimaan enemmän ja on pystytty todistamaan niiden pitkä ja monimutkainen elämä plasmassa ja virtsassa. Ellagitanniinin johdannaiset ovat myös erittäin yksilöllisiä uniikin suolistomikrobiston takia (Espín ym 2007).

Tutkimuksessa mansikoista löydettiin kuusi ellagitanniinia. Ellagitanniinit olivat HHDP:n eri muotoja. Eniten löydettiin agrimoniinia, dimeeristä galloyyli-diHHDP-glukoosia (kuva 6), jota ehdotettiin markkeri yhdisteeksi mansikalle. Mansikoista löydettiin myös neljää erilaista ellagihapoon johdannaista: ellagihappo-deoksiheksosidi, ellagihappo-pentosidiini (engl. *Ellagic acid pentoside*), ellagihappo ja metyyli-ellagihappo-deoksiheksosidi (engl. *methyl-ellagic-acid-deoxyhexoside*) Kaksi viimeistä olivat kromatogrammeissa melkein päällekkäisiä ja ne tunnistettiin ellagihappo-glykosidiksi ja kampferoli-3-glukoronidiksi. Suurin osa lajikkeista sisälsi kuitenkin jälkimmäistä (Aaby, ym 2012).

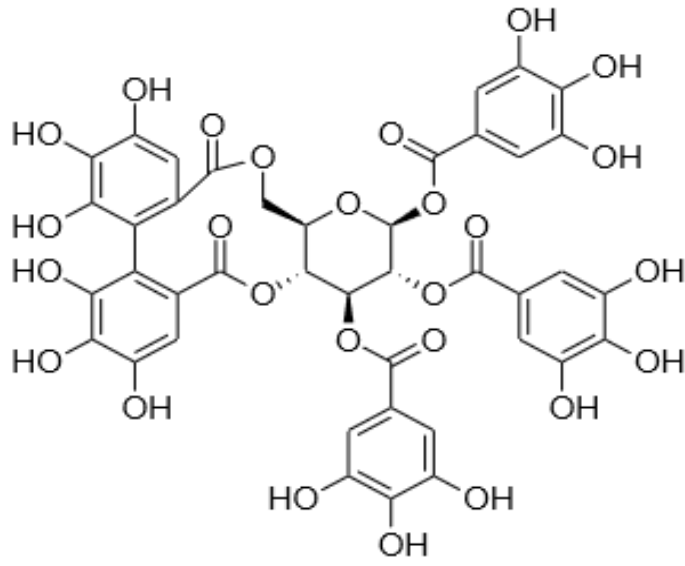
Pentagalloyyyliglukoosi on monien ellagitanniinien perusrakenne, jossa gallushappo yhdisteet liittyvät yhteen, niiden välistä lohkeaa vettä ja liittyy happi (kuva 7). Gallushapot liittyvät keskenään muodostaen heksahydroksyylidifeenihapon, joka on kiinni glukoosikeskuksessa. Muodostuneesta tellimagrandiini II:sta (kuva 8) voi edelleen lohjeta vettä ja reaktio voi jatkua, jolloin loputkin galloyylihapot voivat yhdistyä keskenään (Aaby, ym 2012).



Kuva 6 Agrimoniini



Kuva 7 1,2,3,4,6 pentagalloyylglukoosi, punaisen neliön sisällä on gallushappo yksikkö



*Kuva 8 Tellimagrandiini II*

## 2.7 Antioksidatiivinen kyky

Antioksidatiivinen kyky sitoa happiradikaaleja. Happiradikaaleja ovat esimerkiksi C-vitamiini ja fenoliset yhdisteet, joita mansikoissa on runsaasti. Useiden tutkimusten ja erilaisten metodien perusteella on julkaistu listoja, joissa mansikalla on neljä kertaa enemmän fenolisia yhdisteitä kuin muilla hedelmillä, 10 kertaa enemmän kuin vihanneksilla ja 40 enemmän kuin muroilla. Mansikalla on kahdesta jopa 11-kertainen antioksidatiivinen kyky moniin muihin yleisiin vihanneksiin ja hedelmiin (Giampieri ym 2012).

Fytokemikaalisilla yhdisteillä on eriävät antioksidatiiviset kyvyt. Antioksidatiivista kykyä voidaan vertailla TAC (*Engl. Total antioxidant capacity*), joka kuvaa ruuan kokonaiskykyä toimia antioksidanttina. Yksittäisiä yhdisteitä tutkittaessa eri mansikkalajeissa huomattiin, että C-vitamiini oli yksi tärkeimmistä. C-vitamiinilla oli suurin antioksidatiivinen kyky, joka oli yli 30 %, antocyaaniineilla se vaihteli 25–40 %. Loppu antioksidatiivinen kyky löytyi eri ellagitanniinien johdannaisista ja flavonoleista (Giampieri ym 2012).

TAC:lla tehtiin antioksidanttitutkimus, jossa käytettiin DPPH:ta. Mikrosentrifuugiputkeen lisättiin 500 µL näytettä ja 500 µL DPPH:ta (engl. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), sekoitettiin ja pidettiin huoneenlämmössä valolta suojattuna 30 min. Tämän jälkeen näytteen absorbanssi mitattiin metanolia vastaan 515 nm spektrofotometrillä (Patras ym 2009).

Tutkimukset ovat osoittaneet antosyaanien olevan erittäin imeytyviä ihmiskehossa. On huomattu alle 0,1 % syödyistä antosyaanista löytyvän virtsasta 24 h jälkeen ja vielä vähemmän plasmasta (McGhie ja Walton 2007). Antosyaanien rakenne pysyy stabiilina flavylium kationi-ionina vatsan happamassa pH:ssa, josta päätyy ohutsuoleen. Ohutsuolessa siitä valmistetaan pH-neutraaleja yhdisteitä, kuten hemiketoneja, kalkoneja ja quinoideja. Pieni osa ravintoantosyaaniglukosidejä kuitenkin imeytyy vatsassa sappimuutos myötä (engl. *bilitranslocase*) (Passamonti ym 2003). Nämä antosyaaniglukosidit päätyvät maksaan, jossa niistä tehdään muita yhdisteitä. Osa kuitenkin pääsee ohi ja suolistomikrobit muokkaavat antosyaaneista tarvittavia pienempiä fenolisia happoja, kuten 4-hydroksyylibentsoe-happoa (Francesca ym 2014).

### 3 Mansikka yhdisteet

Nuorilla mansikoilla on enemmän fenolisia yhdisteitä ja suurempi antioksidatiivinen kyky. Antosyaaneja löytyy eniten mansikan kypsästä punaisesta osasta, kun taas vaaleanpunaisessa osassa niitä oli vähemmän. Raa'asta valkoisesta osasta ei löydy lainkaan antosyaaneja. Antioksidatiivinen kyky laskee kypsytyksen kanssa, kun fenoliset yhdisteet vähenevät. Fenolisia yhdisteitä käytetään muihin johdannaisiin, joita mansikka valmistaa kypsyessään (Giampieri ym 2012). Yleisesti mansikoiden väri arvioidaan ennen keräystä ja näytteet kerätään samana vuodenaikana, jolloin eri aikoina kerättyjä näytteitä voidaan verrata keskenään (Ulrich, ym 2018).

Tieteellisessä tutkimuksessa näytteiden määrällä on huomattava merkitys. Näytteiden vähäinen määrä johtaa yleisesti määrälliseen eikä laadulliseen heittelyyn tuloksissa. On myös mahdollista, että laadullista heittelyä tapahtuu, jos näytepartikkelien koko on liian pieni ja vähäinen, jolloin arvo voi jäädä havaintorajan alle (Ulrich D., ym 2018).

Mansikan geneettistä perimää voidaan tarkastella mikroravinteiden ja fytokeemikaalien määrän avulla. Ne vaihtelevat lajien ja kasvuympäristön mukana. Tutkimuksissa on huomattu myös, että jos ympäristössä on paljon kasvua haittaavia tekijöitä, isompien tanniinien määrä kasvaa. Suuremmat tanniinit ovat yleensä kasvin puolustuskeino elollisia ja elottomia uhkia vastaan (Wang ja Miller 2009). Tutkimuksessa kasvatettiin mansikoita kompostipellolla ja huomattiin näillä mansikoilla olevan merkittävästi enemmän fenolisia yhdisteitä, flavonoideja, antosyaaneja ja happiradikaaleja absorboivia yhdisteitä, kuin perinteisellä tavalla kasvatetuilla. Samassa tutkimuksessa tutkittiin omenaviinietikan vaikutusta antosyaanien määrään ja huomattiin sen lisäävän syanidiinin ja pelargonidiinin johdannaisia, mutta vähensi sokerin määrää mansikoissa (Wang ja Miller, 2009).

Sekundaariset yhdisteet ovat yleisesti mansikan terveyttä edistäviä ja siksi on tärkeää tietää kuinka ympäristö ja lajike vaikuttavat mansikoiden sekundaarisiin yhdisteisiin. Sekundaarinen yhdiste on mansikan oma puolustusjärjestelmä, ulkoisia vaikutteita vastaan. Viime vuosina on todistettu antosyaanien määrän olevan vahvasti yhteydessä lajikkeeseen ja tämän vuoksi on aloitettu monia jalostusohjelmia parantamaan antosyaanien määriä (Giampieri ym 2012).

Säilöminen vaikuttaa mansikoiden ravintoaineisiin. Pakastuslämpötila on tärkeä fenolisten yhdisteiden kannalta, sillä se vähentää antosyaanien reaktioita. Flavonoidiyhdisteiden määrä kasvaa pakastuksen yhteydessä, sillä keräyksen jälkeiset reaktiot alkavat, mutta ne hidastuvat ajan kuluessa. Antioksidatiivisten yhdisteiden määrää kasvaa, mutta hedelmälliset ominaisuudet kuten maku ja haju voivat vähentyä pakastuksen seurauksena (Kevers ym 2007). Tutkimuksessa nähtiin myös mansikoiden olevan myyntikuntoisia neljä päivää huoneenlämmössä ja 11 päivää jääkaappi säilytyksen jälkeen (Piljac-Žegarac ja Šamec 2011).

Vaikka mansikat useimmin syödään tuoreena, on se monesti prosessoitu erilaisiksi tuotteiksi kuten hilloiksi, juomiksi ja kuivatuiksi tuotteiksi. Yleisiä tapoja prosessoida mansikoita ovat mehuksi konsentointi tai lämmittäminen tyhjiössä. Tutkimukset osoittavat antioksidatiivisten yhdisteiden vähenevän prosessoinnin yhteydessä ja tämä väheneminen on suoraan verrannollinen prosessoinnin kestoon ja vaiheiden määrään. Tällä tiedolla teollisuus pyrkii vähentämään tarpeettomia vaiheita mansikoiden prosessoinnissa ja pitämään antioksidantti pitoisuuden korkeana.

### **3.1 Mansikan aromit**

Mansikan aromi määrittyy monista yhdisteistä, joista suurin osa valmistuu kypsymisen aikana 10–100 ppm konsentraatiossa tuoreessa painossa. Melkein kaikki muodostetaan haihtumattomista esiyhdisteistä, kuten aminohapoista ja lipideistä. Valmiit yhdisteet voidaan jakaa useisiin eri ryhmiin kuten aldehydit, orgaaniset hapot, ketonit, esterit, laktonit, asetaalit, rikki yhdisteet, furaanit, fenolit, epoksidit ja terpeenit. Vaikka jotkin yhdisteet ovat läsnä erittäin pienissä määrissä, ovat ne silti tärkeitä mansikan aromin muodostumiselle (Aharoni ym 2004).

Eräässä tutkimuksessa tutkittujen mansikoiden (Festival ja Radiance) aromit jaettiin kuuteen ryhmään: hedelmäinen, kukkainen, makea, epävakaaat hapot, vihreä ja muut. Samaisessa tutkimuksessa huomattiin eroja aromiprofiilien välillä, kun tarkasteltiin talvella ja keväällä kasvatettuja mansikoita (Xiaofen Du, ym 2011).

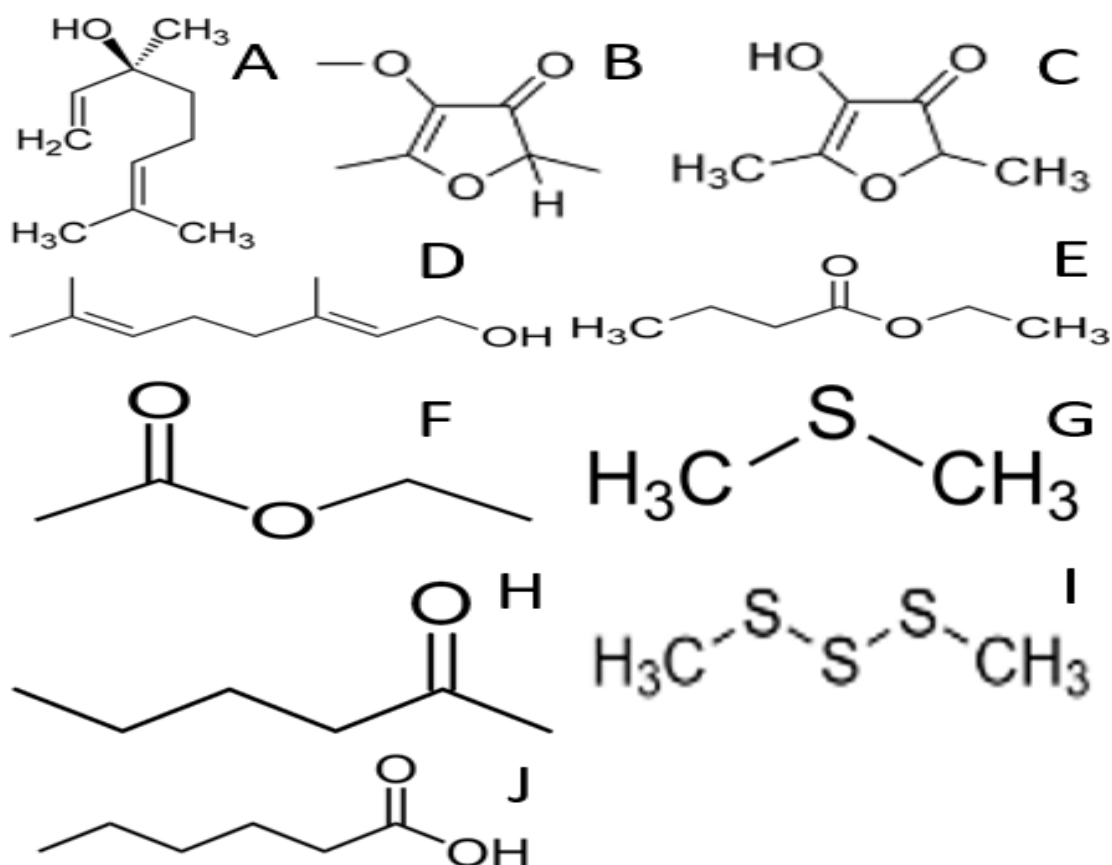
Hedelmäinen oli suurin aromiryhmä. Noin puolet tunnistetuista yhdisteistä koettiin hedelmällisiksi ja suurin osa tunnistetuista yhdisteistä oli estereitä.

Makeus koettiin makuna sokereiden vuoksi ja yhdistetään hedelmäiseen makuun. Jotkin yhdisteet koettiin makeiksi mieltymysten takia, kuten 2,5-dimetyyli-4-methoxy-3(2H) -

furanoni (kuva 9 B) ja 2,5-dimetyyli-4-hydroksi-3(2H) -furanoni (kuva 9 C). Nämä koettiin makeina, kuten hattarana tai karamellina (Xiaofen Du, ym 2011). Edellä mainitut yhdisteet löytyvät myös muista hedelmistä ja marjoista kuten ananaksista, mangosta ja tomaateista (Xiaofen Du, ym 2011).

2-metyyli-butaanihappo on yhdiste, jolla on kaksi eri enantiomeeriä S ja R. S-muoto koetaan mukavana ja hedelmäisenä makuna ja R-muoto hikisenä ja juustoisena. WHO:n ja YK:n elitarvike- ja maatalousjärjestön mukaan liiallisella määrällä ei ole haitallisia vaikutuksia.

Etyyliasettaatti (kuva 9 F), etyylibutyraatti (kuva 9 E) ja 3-metyyli-heksyyliasettaatti ovat yleisiä aromaattisia yhdisteitä, joita löytyy useista viineistä (Feng ym 2015). Etyylibutyraatti haisee ananasmaiselta ja on käytössä varsinkin appelsiinimehun valmistuksessa, mutta muodostuu myös muissa hedelmissä ja marjoissa.



Kuva 9 A: Linaloli, B: 2,5-dimetyyli-4-metoksi-3(2H) -furanoni (DMMF) C: 2,5-dimetyyli-4-hydroksi-3(2H) -furanoni (DMHF) D: Geranioli E: Etyylibutyraatti F: Etyyliasettaatti G: Dimetyylisulfidi H: (E)-2-heksaani I: Trimetyylisulfidi J: Kapronihappo

Kukkainen oli vähiten tunnistettu ominaisuus tutkimuksessa. Terpeni alkoholit kuten linaloli (kuva 9 A) ja geranioli (kuva 9 D) ovat tärkeitä kukkaisuus yhdisteitä. Linaloli löytyy monesta kasvista ja useimmista mansikkalajikkeista. Geranioli on myös todettu olevan tärkeä yhdiste mansikoissa ja sen tunnistusraja on 10 µg / kg kohti (Du ym 2011).

Epävakaaita happoja ja vihreää ominaisuutta kuvaavia yhdisteitä oli vähän. Vihreitä yhdisteitä olivat heksanaali, (E)-2-heksanaali ja (Z)-3-heksanoli. Erityisesti (E)-2-Heksaani on vastuussa ”tuoreen mansikanhajusta” useissa lajikkeissa. Epävakaaita happoja tunnistettiin tutkimuksessa kolme. Vihreää kuvaavia yhdisteitä löytyy usein tuoreista hedelmistä (Xiaofen Du, ym 2011).

Muita yhdisteitä, kuten dimetyylisulfidia (kuva 9 G) ja trimetyylidisulfidia (kuva 9 I) löytyy ja ne koettiin ”valkosipulimaisena” ja ”kaalimaisina”. Rikkiesterien määrä nousee lämpöprosessissa, kun mansikkahilloa valmistetaan (Xiaofen Du, ym 2011).

Toisessa tutkimuksessa mansikoita, vadelmia ja mulpereita fermentoitiin alkoholeiksi ja verrattiin keskenään. Suurin osa haihtuvista yhdisteistä oli alkoholeja, jonka jälkeen estereitä, happoja ja aldehydejä ja ketoneja. 1-propanolia ja 1-butanolia löytyi vain mansikkaviineiltä (Feng Y., ym 2015).

Mansikasta on löydetty yli 979 erilaista haihtuvaa orgaanista yhdistettä (engl. *Volatile organic compound* (VOC)). 2015 Cannon ym löysivät 553 uutta yhdistettä mansikasta. He käyttivät 100 kiloa 'Cliforette' mansikkalajiketta 200 litraan saturoitua CaCl<sub>2</sub>, joka oli 10 °C ja sekoitettiin 2 tunnin ajan. Neste siivilöitiin useasti. Neste siirrettiin toiseen astiaan 50 litran dikloorimetaanin kanssa 10 minuutin ajan. Nesteiden annettiin erottua yön yli ja noin 45 litraa dikloorimetaania erotettiin ensimmäisellä kerralla. Rajapinta siirrettiin erilliseen astiaan, johon lisättiin vettä ja dikloorimetaania. Orgaaninen kerros kerättiin talteen. Näytteet eroteltiin uudelleen 50 litran dikloorimetaanin kanssa. Pyöröhaihduttimella orgaaniset näytteet kuivattiin 100 ml:aan. Näytteet jaettiin 125 fraktioon ja kaasukromatografian avulla järjestettiin kronologisesti 5 eri ryhmään. (Cannon R., ym 2015). Mansikkauutteet ja fraktiot analysoitiin polaaraisella ja polaarittomalla faasi kolonilla.

Tutkimuksessa löydettiin 557 haihtuvaa yhdistettä, joista 6 tunnistettiin yhtäaikaisella eluutiolla ja loput vertaamalla kirjallisuuteen. 322 yhdistettä tunnistettiin ensimmäistä kertaa mansikoista. Yhteensä 979 haihtuvaa yhdistettä on löydetty mansikoista kaikkiaan. Yhtäkään noista yhdisteistä ei löydetty kaikista tarkastelluista artikkeleista ja 959 yhdistettä mainittiin alle puolissa artikkeleista. Voidaan näin päätellä, että on vaikeaa päästä yksimielisyyteen mitä yhdisteitä mansikasta löytyy, vaikka mansikoista on tehty kattavaa analyttistä tutkimusta (Ulrich D., ym 2018).

## 4 Mansikat ja terveys

Mansikoiden bioaktiivisuutta on tutkittu pitkään *in vitro* ja eläinkokeissa. Mansikan uskotaan vaikuttavan terveyden moniin eri osa-alueisiin. Mansikat voivat ehkäistä liikalihavuutta, diabetesta ja vähentää syövän riskiä, sydän- ja verisuonitauteja ja estää tulehduksia (taulukko 3).

Mansikan polyfenolien imeytyminen, käyttöä ja ulostusta on vaikeaa tutkia mutta niiden tutkiminen on tärkeää, jotta saadaan kokonaiskuva taudinkehityksestä ja terveyttä edistävästä vaikutuksesta.

Monissa terveystieteellisissä ja lääketieteellisissä tutkimuksissa on osoitettu, että runsaasti hedelmiä ja vihanneksia sisältävä ruokavalio ehkäisee sairauksia. Mansikat (*fragaria x ananassa*) ovat erittäin hyvä bioaktiivisten yhdisteiden lähde. Mansikka sisältää paljon tärkeitä vitamiineja ja mineraaleja. Ne sisältävät myös korkeita määriä C-vitamiiniä, folaatteja ja fenolisia yhdisteitä kuten antosyaaneja, flavonoleja, flavanoleja, ellagitanniineja ja fenolisia happoja. Fenoliset yhdisteet on todistettu olevan antioksidatiivisia *in vitro* ja *in vivo* testeissä (Afrin S. ym 2016).

Taulukko 3 Sairauksia joihin mansikka auttaa, miten ja kuinka paljon on annettu tutkimuksessa (Afrin ym 2016).

Sairaus	Mansikanmäärä	Helpotus	Havainnot
Tulehdus	305 g mansikkajuomaa, jossa kokonaisfenolien määrä 12,66 mg / g kuiva paino	Aterian jälkeisen tulehdus väheni merkittävästi ja insuliinin vaikutusaika lyheni	Vähensi hapettumista stressistä aiheutuvista muutoksista.
Syöpä	300 g päivässä	Vähensi syöpää aiheuttavaa NDMA:n, dimetyylitrosamiinin, muodostumista	Vähensi nitroontumista ruokavaliossa vähentämällä nitrosoamiinin muodostumista
Diabetes	2 mukia mansikkajuomaa (25 g kylmäkuivattua mansikkaa) tai mansikanmakuista kalori juomaa	Paransi joitain riskejä sydän- ja verisuonitautien vaikutuksia 2. tyypin diabetes henkilöillä	Vähensi kolesterolia ja pienensi HDL-kolesterolin suhdetta, ylläpiti verenpainetta
Liikalihavuus	80 g / päivittäin jäätyneitä mansikoita	Vähensi sydän- ja verisuonitautien mahdollisuutta ja muita liikalihavuuden riskejä	Vähensi plasman kolesterolia ja HDL-kolesterolia
Hapettuminen	300 g tuoreita ja pakastettuja mansikoita	Lisäsi plasman antioksidanttikykyä ja suojeli sen proteiineja happiradikaaleilta	Vaikutti oksidatiiviseen reaktioon
Sydän- ja verisuonitaudit	500 g päivittäin kuukauden ajan, jossa kokonaisfenoli määrä 2,26 mg / g	Vähensi tauteja parantamalla lipidiprofiilia ja antioksidanttien määrää	Esti ruuan jälkeisen hapettuneen LDL lisääntymistä, paransi veren antioksidantti kykä ja suojeli sen aiheuttamilta vahingoilta.

## 4.1 Tulehdusta estävät ominaisuudet

Tulehdustila on kehon vaste siihen kohdistuviin sisäisiin ja ulkoisiin häiriöntekijöihin, mutta jatkuva tulehdus voi satuttaa ihmistä ja johtaa vakavimpiin sairauksiin. Jatkuva tulehdustila on liitetty moniin eri sairauksiin, kuten syöpään, sydän- ja verisuonitauteihin sekä tyypin 2 diabetekseen. Eräässä tutkimuksessa liikalihavat ihmiset söivät tasapainoisen korkeahiilihydraattisen, keski-rasvaisen aterian, jonka yhteydessä heille annettiin mansikkajuomaa tai placeboa. Aterian jälkeinen veritesti näytti mansikkajuoman vähentävän insuliinivastetta ja heikentävän tulehdusta vähentämällä IL-6 ja C-reaktiiviproteiineja. Samankaltaisessa tutkimuksessa todettiin mansikkajuoman tai antioksidantti- ja polyfenolisenpitoisen ruuan nauttimisen vähentävän kehon tulehdustilaa (Ellis ym 2011).

## 4.2 Sydän- ja verisuonitaudit

Mansikat vähentävät sydän- ja verisuonitautien määrää estämällä tulehdusta ja parantamalla plasma-lipidi suhdetta. Varsinkin naisilla mansikan syönti vähensi sydän- ja verisuonitautien määrää ja vakavuutta. Tutkimuksessa 29 966 naisen ruokailutottumuksia tutkittiin ja mansikan syönnin ja sydän- ja verisuonitautien välillä ei ollut yhteyttä. Naiset söivät vain 1–3 annosta viikossa. Kuitenkin naisilla, jotka söivät kaksi tai enemmän annosta oli selvä ja merkittävästi pienempi riskien sairastua sydän- ja verisuonitauteihin (Sesso ym 2007). Lisää tutkimusta kuitenkin tarvitaan, jotta voitaisiin muodostaa johtopäätös mansikan yhteydestä sydän- ja verisuonitauteihin.

Mansikoiden syönti voi vaikuttaa verisuoniin usealla eri tavalla, kuten estämällä happiradikaalien vaikutusta ja antioksidatiivinen vaikutus suuren C-vitamiini määrän takia. Myös antosyaanit, ellagihapot ja 2,5-dimetyyli-4-hydroksi-3-[2H] -furanoni (kuva 9 B) ovat tutkimuksissa osoittaneet antioksidatiivisia ominaisuuksia ja olivat erittäin reaktiivisia *in vivo* testeissä.

## 4.3 Syöpä

Useissa tutkimuksissa on huomioitu marjojen syöpää alentavia vaikutuksia. Tämä johtuu mansikan suuresta antioksidatiivisesta kyvystä. Antioksidatiivisen kyvyn ja aktiivisuuden

uskotaan olevan ensimmäisiä mekanismeja reaktiivisten happiradikaalien keräämiseen ja näin vähentävät DNA vahinkoa. Ne stimuloivat antioksidatiivisia entsyymejä, estävät karsinogeenisen DNA:n kehittymistä ja lisäävät DNA:n korjausta (Stoner ym 2008). In vivo testeissä fenolit muokkaavat solusignalointia syöpäsoluissa ja täten vähentävät syöpää estävien geenien demetylointia, lisäten solun DNA:n korjausta tai aktivoiden apoptoosin (Wang ym 2013).

Eräässä tutkimuksessa mansikoita syötettiin ihmisille ja seurattiin karsinogeenin dimetyylnitrosamiinin muodostumista. Tutkittaville annettiin paljon amiinia sisältävää ruokaa nitraatin kanssa. Tutkijat huomasivat, jos annettiin 3 ml mansikkaa heti ruokailun jälkeen, oli ulosteessa  $72 \pm 4$  % vähemmän dimetyylnitrosamiinia kuin kontrolliryhmällä (Chung ym 2002).

Mansikan muut yhdisteet kuten vitamiinit A, C, E ja foolihappo, mineraalit kuten kalsium, seleeni, ravintokuidut ja esterit ovat osoittaneet syöpää ehkäisevää kykyä monissa syövän vaiheissa. Varsinkin ellagihappolla on huomattu syöpää ehkäisevä kyky toimia antikarsinogeeninä syövän synnyn ja synnyn jälkeisissä vaiheissa in vivo ja in vitro kokeissa. Monien muidenkin fenolisten yhdisteiden syövän vastaiset ominaisuudet on huomattu ja tutkittu. Erityisesti antosyaani ja tanniinipitoisten marjauutteiden on huomioitu olevan erittäin tehokkaita. Varsinkin tanniinirikkaat, joissa on paljon proantosyaniideja ja ellagitanniineja, ovat tehokkaita syövän estäjiä. Bioaktiivisten yhdisteiden syöpävastaisuus on monien eri mekanismien yhteistyötä. Eräässä tutkimuksessa seurattiin mansikkauutteen vaikutusta HeLa syöpäsolujen kasvuun. Mansikan huomattiin vähentävän kasvua  $\leq 50$  % kontrollista  $50 \mu\text{l} / \text{ml}$ . Kyseisessä tutkimuksessa verrattiin myös muita marjoja ja mansikka oli tehokkain kyseisen tutkimuksen mukaan (McDougall ym 2008).

#### **4.4 Antimikrobinen kyky**

Ihmisen suolisto on monimutkainen. Suolistossa elää yli 1014 bakteeria ja yli 400 eri lajia riippuen ihmisestä. Nämä bakteerit ovat keskeinen osa ihmisen metaboliaa, ja näitä säätelämällä voidaan heikentää sairauksien oireita kuten laktoosi-intoleranssia. Voidaan myös ehkäistä eri uloste sairauksia, kuten ripulia. Kasveilla, marjoilla ja hedelmillä on useita eri fenoleita, joilla on eri ominaisuuksia ja vaikutuksia suolistomikrobistoon

(Puupponen-Pimiä ym 2000). Kasvien fenoliset yhdisteet voivat ehkäistä haitalliset bakteerikantojen syntyä ja vahvistaa haluttuja bakteerikantoja.

## 5 Fermentointi hiivat

Hiivat ovat tärkeä osa alkoholien valmistusta. Niiden lajikkeet vaikuttavat merkittävästi muodostuviin yhdisteisiin ja niiden pitoisuuksiin. Antosyaanit ja tanniinit, sekä hiivan muut tuotteet vaikuttavat suutuntumaan ja makujen monimuotoisuuteen. Tässä työssä käytettiin *Torulaspora delbrueckii* ja *Saccharomyces cerevisiae* hiivoja. Molemmat tuottavat valmistajan mukaan vähän haihtuvia happoja, kuten tanniineja ja antosyaaneja. Eräässä tutkimuksessa käytettiin korkeasokerista seosta lähtöaineena. Huomattiin *Saccharomyces*-sukuun kuulumattomien hiivojen aloittavan fermentoinnin nopeammin, mutta hidastuvan fermentoinnin edetessä, sillä se ei ole yhtä etanolikestävä kuin *Saccharomyces* (Heard and Fleet, 1985). Muissa tutkimuksissa huomattiin *Torulasporalla* olevan positiivinen vaikutus aromiin, makuun ja sen muodostavan vähemmän asetaldehydiä, asetonia, asetaattia ja etyyliasetaattia (Bely ym 2008).

Pelkästään *T. delbrueckii* sisältävässä fermentoinnissa huomattiin sen tuottavan vähemmän CO<sub>2</sub>:a. Noin 35 g / pulloa kohti on normaali määrä 14 % alkoholissa ja huomattiin *T. delbrueckii* hiivojen tuottavan 18,7 g ja 23,9 g CO<sub>2</sub>:ta. *Torulaspora delbrueckii* hiivakantoja käytetään myös teollisuudessa, sillä se tuottaa vähän 'off-flavour' yhdisteitä. Kyseisiä ei haluttuja yhdisteitä ovat acetaalialdehydi, asetoni, hydrogeenisulfidi ja etyyliasetaatti (Puertas ym 2017). Se myös tuottaa enemmän haluttuja yhdisteitä kuten glyserolia ja hedelmäisiä estereitä (Zhang ym 2022).

Kun fermentointi oli viety loppuun asti, nähtiin kuinka pelkästään *Torulasporaa* sisältävässä pastoroidussa mehussa etanolia oli noin 7 % ja ei pastoroidussa 10,5 %. *Saccharomycesille* samat arvot olivat 14,23 % ja 14,10 %. *Torulasporat* valmistivat myös vähemmän haihtuvia happoja ja asetaldehydejä. Ne myös valmistivat vähemmän soluja ja siinä olivat korkeimmat typpijäänteet (Bely ym 2008).

Useat *Saccharomyces Cerevisae* hiivat ovat suunniteltu rypälewiineille ja ne ovat vähemmän käytettyjä marja- ja hedelmäviinien valmistuksessa. Muita hiivalajeja ei käytetty suuren pilaantumisriskin vuoksi, mutta uusien tutkimusten perusteella on löydetty useita parempia ominaisuuksia tähän tutkimukseen kuin perinteinen *Saccharomyces Cerevisae* (Canonico ym 2016). Ei – *Saccharomyces* hiivoja pidettiin heikon fermentoinnin takia huonompina. Ne muodostivat suuren määrän tuntemattomia yhdisteitä ja monimutkaisia yhdisteitä, joita pidettiin haitallisina ja laatua heikentävinä (Ciani ym 2019).

Ei – *Saccharomyces* hiivojen syrjintä on vähentynyt lisääntyvän tutkimuksen myötä. Useissa tutkimuksissa on löydetty positiivisia ominaisuuksia alkoholiin, kuten vähentynyt antosyaanin imeytyminen, voimakkaammat aromit, makujen monimuotoisuus ja stabiilien väripigmenttejen muodostuminen kuten proantosyaanit ja pyranoantosyaanit. Kuitenkin hiivoja käytetään yhdessä juomien valmistuksessa ei – *Saccharomyces* hiivojen heikon fermentoinnin takia. Näin saadaan kummastakin hiivasta paremmat puolet esiin (Medina ym 2018) (Chen ym 2018). *T.Delbrueckii* vaikuttaa antosyaanin ja antosyaani-johdannaisten yhdisteiden profiileihin viinissä.

Tutkimuksessa huomattiin osan *T. delbrueckii* kannoista fermentoivan sokereita, maltoosia, glukoosia ja sakkaarosia. Kantojen matalampi alkufermentointi nopeus ja heikompi fermentointi olivat haluttuja ominaisuuksia valmistaessa matala-alkoholisia juomia. Tutkimuksessa verrattiin myös hiivasekoituksia, joissa *T. delbrueckii* ei hävinnyt *S. cerevisiae*lle (Canonic ym 2016).

Alkoholin valmistuksessa muodostuneet suuremmat alkoholit (engl. *Higher alcohols*) ja esterit ovat tärkeä määritelmä korkealaatuisille juomille. Erityisesti fenyyli-etyyli-asetaatti (kukkainen, hunajainen, makea), etyyli-oktanoaatti (omenainen, anisruohon maut) ja etyyli-heksanaatti (omena, hedelmäiset maut) ovat haluttuja ja niitä nähtiin enemmän juomilla, jotka olivat valmistettu *T. delbrueckii* hiivalla kuin *S. Cerevisiaella*. Tutkimuksessa kerrottiin mahdollisuudesta käyttää kumpaakin hiivaa yhdessä fermentoimaan, luoden erilaisia aroma yhdisteitä (Canonic ym 2016).

*Taulukko 4 Tässä työssä hiivojen väliset ero (Canonic ym 2016)t*

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
Tuottaa etanolia koko ajan ja kestää hyvin etanolia viinissä	Nopeampi fermentoinnin alku, mutta hidastuu korkeassa etanolissa
Iso osa etanolista fermentoidaan nopeasti fermentoinnin ensimmäisessä vaiheessa.	Vähemmän asetaldehydiä ja vähän haihtuvia happoja
	Heikompi etanolin tuottaja, mutta tuottaa tasaisesti koko fermentoinnin ajan.

## 6 Materiaalit ja menetelmät

### 6.1 Tavoite

Tämän pro gradu - tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää kolmesta mansikkalajikkeesta sekä kahdesta hiivalajikkeesta valmistettu matala-alkoholinen juoma, sekä tarkastella sen kemiallisia ja aistittavia ominaisuuksiin. Mansikka on suosittu kotimainen marja, jolla on jo useita käyttökohteita ja näin halutaan laajentaa näiden tuotteiden määrää. Vähäisellä prosessoinnilla ja paikallisilla marjoilla olisi markkinarako juomateollisuudessa ja halutaan tutkia mahdollisia käyttökohteita juomanvalmistuksessa.

### 6.2 Mansikkalajikkeet, hiivat ja mehujen valmistus

Työssä valmistettiin Luonnonvarainkeskukselta saaduista mansikoista mehua, jotka fermentoitiin matala-alkoholiseksi juomiksi. Mansikat kerättiin kesäkuussa (Honeoye) ja heinäkuussa (Lumotar ja Polka), lajikkeet oli kasvatettu Kaarinassa Luonnonvarakeskuksessa (Luke). Mansikat olivat kerätty kypsinä koulutetun henkilökunnan toimesta optimaalisesti. Marjat ja kannat oli säilötty -20 °C heti poiminnan jälkeen ja pidettiin siellä prosessointiin saakka. Jäädetyt marjat sulatettiin mikroaaltouunilla (MW201, Whirlpool, Kiina) 160 W. Polka mansikoita oli 3700 g, Lumotarta oli 2362 g ja Honeoyeta oli 2858 g, joista valmistettiin mehupuristimella mehua (Vita Pro-Active JE810; Kenwood). Mehun saanto oli noin 70 %, joista 500 ml Polka ja Honeoye mehuja fermentoitiin kokeiluna. Haaleisiin mehuihin lisättiin Pectinex Ultra SP-L (Novozyumes, Denmark) (0,25 % v/v) rikkoakseen solurakenne ja annettiin vaikuttaa noin 20 min huoneen lämmössä. Entsyymikäsitellyt mehut pasteroitiin vesikylvyssä (97 °C) 30 sekunnin ajan, jonka jälkeen siirrettiin jäähauteseen. Mehuja pastoroitiin 250 ml kerrallaan ja siirrettiin 500 ml steriloituihin Duran pulloihin.

### 6.3 Fermentointi

Ennen mansikoiden fermentointia tehtiin harjoitusfermentointi pienemmällä määrällä mehua. Fermentoitiin Polka ja Honeoye mansikkamehua *Torulasporea delbrueckii* ja *Saccharomyces cerevisiae* hiivoilla. Hiivoja käytettiin 25 g / 100 l, josta voidaan laskea tarvittava hiiva, kun käytettiin 1 l kumpaakin mehua. Mehuihin lisättiin pektinaasia 2,5 ml / 1000 ml. Pastoroitiin 90-95 °C 3 min ja 95 + °C 3 min. Siirrettiin jäähauteseen jäähtymään heti. Lisättiin hiivat mehuun ja kasvatettiin hiivaa 37 °C:ssa 8 minuuttia 250

ml näytteessä. Näytteet otettiin pois vesihauteesta ja lisättiin ¼ mehua 2 min välein, jotta päästiin huoneenlämpötilaan. Jaettiin mehut 250 ml per astia ja säilöttiin huoneenlämpöön, poissa valolta. Annettiin fermentoitua, kunnes sokerit loppuvat. Oikea fermentointi tehtiin samalla tavalla, mutta näytteitä oli enemmän ja duplikaatteina. Mehua oli neljä litraa (1,5 L Polkaa, 1,5 L Honeoyeta ja 1 L Lumotarta). Näytteistä mitattiin Brix° ja paino päivittäin (Kuvat 21. ja 22.). Siiderit nimettiin lajikeen ja hiivan avulla, esim. Polka *Saccharomyces cerevisiae* on PS, Polka *Torulasporea delbrueckii* on PT.

Fermentoinnin jälkeen näytteet jaettiin 50 ml falcon-putkiin ja fuugattiin (Thermo-Fisher Scientific, Sorvall TC 6, Massachusetts, USA) (10 min, 4 °C, 2400 G) ja supernatantti kerättiin talteen aistinvaraisia arviointeja varten erillisiin astioihin. Mehu valmistettiin elitarvikekäyttöön.

## 6.4 Sokeri ja happo analyysi

Mansikkamehulle tehtiin sokeri ja happo analyysi. Tartarihappo ja sorbitoli sisäisinä standardeina. C näytteitä valmistettiin kolme, yksi jokaiselle lajikkeelle ja D näytteitä yhdeksän, triplikaatit jokaiselle lajikkeelle. Standardit olivat 0,5 g / 100 ml konsentraatiolla. Filteröitiin näytteet 0,45 µm filterin läpi läpinäkyviin Eppendorf-putkiin ja siirrettiin 750 µl autosamplerpulloihin. Näytteet kuivattiin N<sub>2</sub>-virran alla lämpöblokillä, kunnes vesi oli haihtunut. Näytteisiin lisättiin 600 µl TriSiliä ja sekoitettiin 5 min vorteksissa. Siirrettiin 30 minuutiksi 60 °C lämpöblokillä, jonka jälkeen annettiin jäähtyä 30 minuuttia huoneenlämpöiseksi. Näytteet ajettiin kaasukromatografilla (Shimadzu GC-2010Plus Autoinjektorilla AOC-20i, liekki ionisaatio detektori Shimadzu Corp., Kyoto, Japani). Kolonina SPB<sup>TM</sup>-1 (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Kantajakaasuna helium 1,9 ml / min, injektio- ja uunilämpötila 210 °C, split/splitless split ratio 15:1, injektio määrä 1 µl, uunin lämpötila 150 °C, pidetään 2 min, nostetaan 4 °C / min 210 °C saakka, jonka jälkeen 40 °C / min 275 °C: seen saakka.

Näytteet ajettiin GC- FID (GC-2010plus, Shimadzu, Japani). Valmistettiin myös ulkoinen etanoli standardi, jolla mitattiin etanolin määrää näytteistä. Valmistettiin standardisuora etanolilla ja vedellä (0 – 9.95 %, R<sup>2</sup> = 0,996).

Näytteissä oli todella paljon sokeria, jolloin sisäistä sokeri standardia ei näkynyt, joten näytteet B ja E valmistettiin uudelleen 0,5 g / 100 ml konsentraatiolla ja ajettiin uudelleen.

Taulukko 5 Sokeri ja happo analyysin standardit

	mQ-H <sub>2</sub> O	Sorbitoli	Tartarihappo	Mehu	Kokonaisuus
<b>A</b>	5 ml				5 ml
<b>B</b>	4,5 ml	0,25 ml	0,25 ml		5 ml
<b>C</b>	4,75 ml			0,25ml	5 ml
<b>D</b>	4,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	5 ml
<b>E</b>	50 µl sokereita ja happoja ulkoiseksi standardiksi				

## 6.5 Aistinvarainen arviointi

Aistinvaraisiin arviointeihin osallistui 10 henkilöä. Ennen arviointeja oli 3 harjoittelukertaa. Harjoittelussa käytiin läpi alkoholijuomien ominaisuuksia, kuten makuja (mansikka, polttava, hapan, makeus, kirpeä ja astringoiva), hajuja (pistävä, alkoholi, fermentoitu, hapan, kukkainen ja väärän hajuinen) ja ulkonäköä (läpinäkyvä, punainen, keltainen ja pinkki). Kaikille osallistujille oli tarjolla vettä ja keksiä puhdistamaan maku ja haju tuntemukset näytteiden välillä jokaisella harjoittelu kerralla.

Johdin harjoituksia, kyselin ja kirjasin ylös mietteitä ja ajatuksia arvioijilta. Ominaisuuksia tarkasteltiin 1–10 jatkuvalla asteikolla, joita verrattiin koulutuksissa yhdessä valittuihin voimakkuuksiin. Ominaisuudet perustuivat toiseen samantapaiseen tutkimukseen (Kårlund ym 2014). Osallistujat saivat kertoa mielipiteitään voimakkuuksista, ominaisuuksien osuvuudesta ja keskustelivat myös keskenään, mikä on sopiva arvo näytteille.

Ensimmäisellä harjoittelu kerralla haettiin sopivia voimakkuuksia ominaisuuksille ja huomattiin erityisesti etikan olevan erittäin voimakas kaikkien osallistujien mielestä. Yleisesti ottaen kaikki standardit olivat liian vahvoja ensimmäisellä kerralla. Näitä laimennettiin merkittävästi seuraavaa harjoituskertaa varten.

Toisella harjoittelu kerralla tarkkailtiin edelleen uusia voimakkuuksia ja myös pyrittiin saamaan kaikki ymmärtämään ja tuntemaan voimakkuudet samalla tavalla. Harjoittelussa pyrittiin saamaan kaikille samat ideat ja arvot kysytyihin ominaisuuksiin, jotta kaikki olisivat samalla tasolla.

Kolmannella kerralla tarkasteltiin kaikki maut, hajut ja värit yhdessä läpi, kerrattiin voimakkuudet. Arvioijat pystyivät kysymään kysymyksiä arvioinnista ja toiminnasta. Lopulliset voimakkuudet olivat arvioijien antaman datan perusteella määritetty, ettei ole liian vahva tai laimea. Ei haluta standardin olevan ääripää arvioinnissa.

Arvioinnit järjestettiin seuraavalla viikolla harjoitteluista. Arviointeja suoritettiin myös kolme kertaa, joissa oli 6 eri näytettä, sekä referenssinäytteet. Näytteitä annettiin 10 ml laseissa, jotka olivat peitettyjä lasikannella ja satunnaistettuja. Arvioijille annettiin myös vettä ja keksiä suun puhdistukseksi. Arvioinnit kestivät noin 20–45 minuuttia. Data kerättiin Compusense Cloud ohjelmalla (versio 19, Guelph, Saksa).

Taulukko 6 Aistivaraisten arviointien standardit ja voimakkuudet

Ominaisuus	Määritelmä	Standardi	Voimakkuus
<b>Maku</b>			
<b>Makeus</b>	Makeus	3 % glukoosi	3,5
<b>Happamuus</b>	Happamuus	0,15 % sitruunahappoa	4
<b>Kirpeä</b>	Kirpeys	0,035 % kofeiinia	6
<b>Astringeys</b>	Kuiva suutuntuma	0,3 % AlSo4	6
<b>Yleinen marjainen maku</b>	Ensimmäinen suullinen		3,5
<b>Ulkonäkö</b>			
<b>Läpinäkyvyys</b>	Kuinka paljon juoma estää valon läpipääsyä		
<b>Pinkki</b>	Kuinka pinkki juoma oli		
<b>Punainen</b>	Kuinka punainen juoma oli		
<b>Keltainen</b>	Kuinka keltainen juoma oli		
<b>Hajut</b>			
<b>Yleinen marjainen haju</b>	Kuinka marjainen juoma oli	1-2 hieman sulanutta mansikkaa	8
<b>‘Väärä haju’</b>	Onko juomassa hajuja, jotka eivät kuulu sinne		
<b>Kukkainen</b>	Kuinka kukkainen haju	50 % Seljanmarja mehua vedessä	8
<b>Pistävä</b>	Kuinka pistävä haju oli	20 % etanolia	6
<b>Hiivainen</b>	Kuinka hiivainen haju oli	0,6 g 100 ml vettä	3
<b>Hapan</b>	Kuinka hapan haju oli	10 % etikkaa vedessä	6
<b>Koostumus</b>	Kuinka painava juoma oli	Viskositeetin ja painon tuntu suussa	
<b>Polttavuus</b>	Kuinka polttavalta juoman etanoli tuntui		2

## 6.6 GC-MS

Haihtuvat yhdisteet analysoitiin HS-SPME-GC-MS aikaisemmin käytetyllä ohjelmalla (He ym 2020). Näytteet valmistettiin lisäämällä GC-MS 20 mL lasipulloihin 2 g näytettä ja lisättiin 10 µl sisäistä standardia (4-metyyli-2-pentanol). Näytteistä tehtiin triplikaatit. Näytteitä oli alkuperäinen (P, H, L), pektiinillä käsitelty (PP, PH, PL) ja fermentoidut juomat (PT, PS, HT, HS, LT, LS).

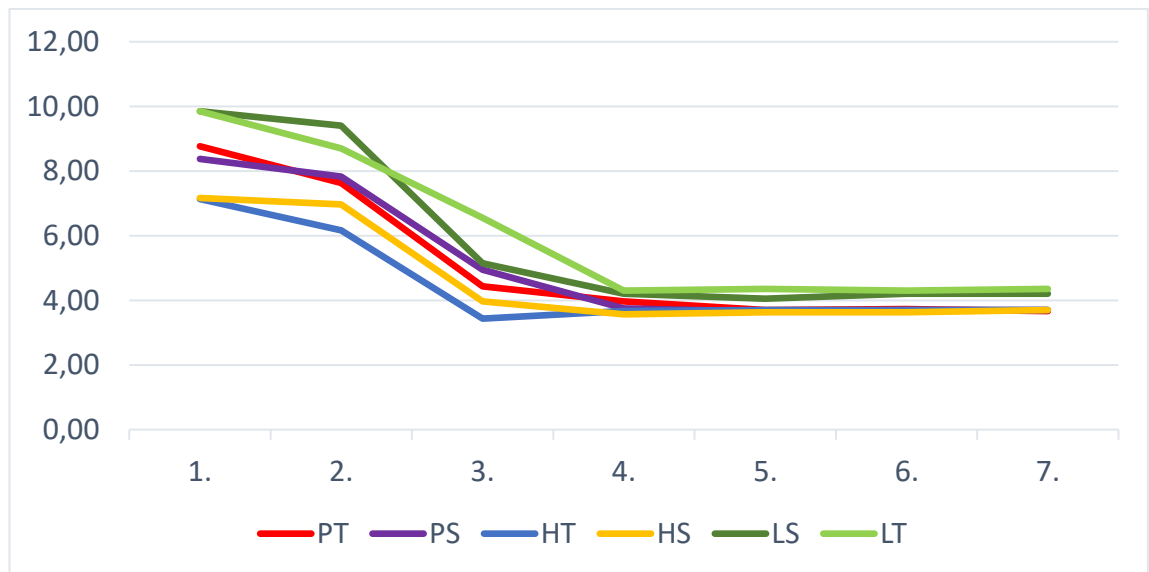
Näytteet analysoitiin myös GC-MS laitteella (Trace 1310 ja ISQ 7000, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Kolonina DB-WAX (60 m, 0,25 mm, 0,25 µm) ja lämpötila oli 50 °C – 200 °C, joka nousi tasaisesti. Näytteet ajettiin myös BP5MS kolonilla (30 m, 0,25 mm, 0,25µm), mutta kromatogrammit olivat huomattavasti huonompia. Dataa analysoitiin NIST webbookin kanssa. Tulosten retentioajat muunnettiin Kovats retentio indeksiin, jotta voitiin verrata näyteitä kirjallisuuteen. Jos samaa kolonia ei löydetty, pyrittiin valitsemaan koloni, joka olisi mahdollisimman lähellä käytettyä kolonia.

TraceFinder 4.1. (Thermo Scientific) käytettiin piikkien analysoimiseen ja alueen määrittämiseen, johon käytettiin ioni kromatogrammia (eng. Total ion chromatogram). Yhdisteet tunnistettiin vertaamalla niiden pinta-alaa sisäiseen standardiin.

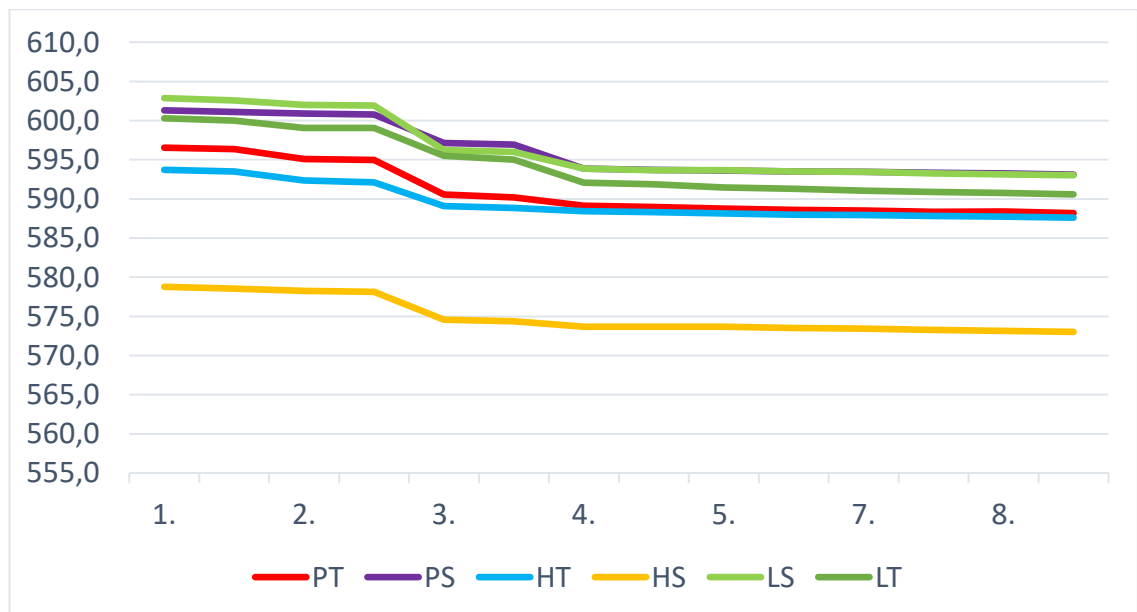
## 7 Tulokset ja niiden tarkastelu

Sokeri ja happo analyysin tuloksia tarkastellessa laskettiin ulkoisten standardien avulla k-arvo. K-arvolla ja sisäisillä standardeilla saatiin laskettua sokerien määrä (g / 100 ml).

Mansikoiden painon ja Brix<sup>o</sup> (kuvat 10. ja 11.) muutosta seurattiin koko fermentoinnin ajan ja näytteiden alkoholi määriteltiin GC:llä valmistamalla etanolista standardisuora. Vertaamalla tuloksia suoraan saatiin alkoholimäärät (Taulukko 7). Alkoholin määrä laskettiin tekemällä kalibrointi suora (0 – 9,95 %,  $R^2 = 0,996$ )



Kuva 10 Mansikan Brix<sup>o</sup> muutos



Kuva 11 Mansikan painon muutos G

Taulukko 7 Valmistettujen alkoholijuomien etanolimäärä

Lumotar <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,39 %
Polka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,39 %
Honeoye <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,70 %
Lumotar <i>Torulaspora delbrueckii</i>	2,65 %
Polka <i>Torulaspora delbrueckii</i>	1,54 %
Honeoye <i>Torulaspora delbrueckii</i>	1,60 %

## 7.1 Aisitinvarainen arviointi

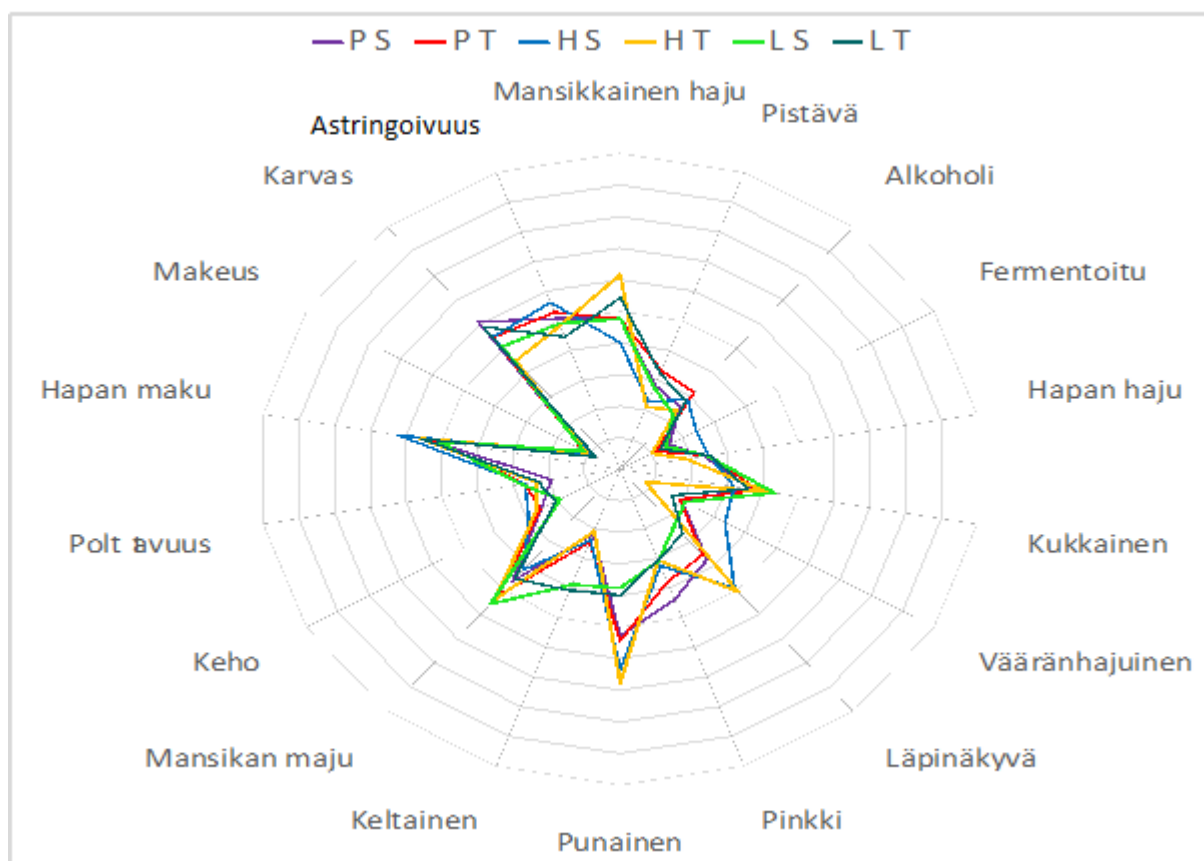
Arviointien jälkeen saatu data analysoitiin tilastollisin menetelmin. Juomien arvosanoista tehtiin kuva 12. Huomattiin lajikkeiden välillä olevan eroja 'pistävydessä' ( $p < 0,012$ ) ja hiivojen välillä oli eroa 'mansikan hajun' ja 'fermentoinnin' ( $p < 0,01$ ) välillä. HS juomassa oli selvästi eroja 'väärä haju' ja 'fermentointi' hajuissa, epäillään juoman joko hieman pilaantuneen tai ylikäynyt verrattuna muihin. Kuitenkaan ulkonäössä tai maussa ei nähty eroja muihin.

Lumotar juomat koettiin keltaisempina kuin muut ( $p < 0,01$ ) ja vähiten koostumusta (engl. *Body*). Honeoye läpinäkyvämpänä ja punaisempina ( $p < 0,01$ ), se myös koettiin vähiten pisteleväenä ja eniten happamana. Polka juomat vaaleanpunaisempina ( $p < 0,01$ ) ja sen arvot olivat usein kahden muun välissä. Nähtiin selkeä ero lajikkeiden välillä. Tarkastellessa tilastollisesti hiiva ja lajikkeita ei löydetty eroja hajun ja maun kanssa.

Makuja tarkastellessa 'makeus' aistittiin alhaisena, joka oli odotettavaa. Juomissa ei ollut sokeria, sillä ne olivat fermentoitu loppuun asti. 'Koostumus' ominaisuudella oli melkein tilastollista eroa ( $p < 0,05$ ), mutta on vaikeaa määrittellä koostumusta, kun näytteet olivat todella lähellä toisiaan.

Yksittäisiä mehuja tarkastellessa HT olisi paras juoma. Korkea marjaisuus, mansikkaisuus ja yleinen laatu, matalin fermentoinnin haju ja 'väärä haju' ominaisuudet. HS oli taas korkein astringoivuus ja koostumus.

Mansikka juomien laatu saattoi laskea vähäinen makeus, sillä mansikat koetaan makeina ja halutaan juomankin olevan sellainen. Myös etanolin määrä vaikuttaa makeuteen ja täyteläisyyden tunteeseen (Ramsey ym 2018).

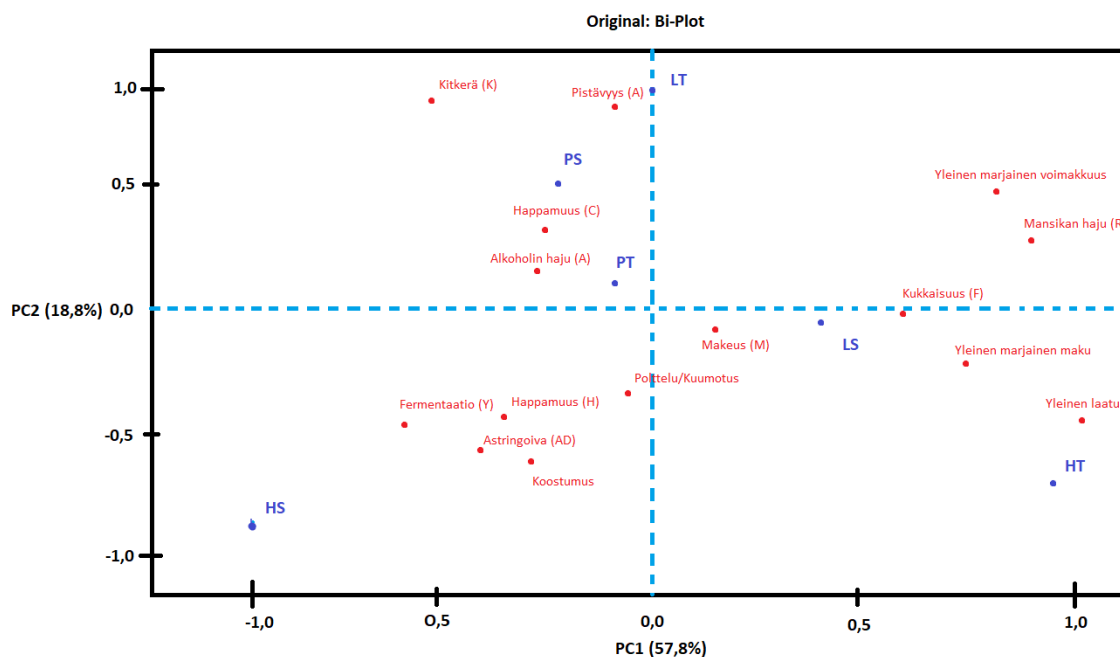


Kuva 12 Polka, H: Honeoye, L: Lumotar, S: *Saccharomyces cerevisiae*, T: *torulaspora delbrueckii*. Kuvataan Mansikkajuomien ominaisuuksia 0 - 10 asteikolla

## 7.2 Pääkomponenttianalyysi

Saadusta aistidatasta muodostettiin päämonimuuttujakuvaaja (engl. *Principal component analysis*, PCA), jolla voitiin nähdä kuinka juomat ja ominaisuudet toimivat yhdessä (kuva 13). Pääkomponenttianalyysi suoritettiin valmistetuista juomista. Lataukset ovat 57,8 % ja 13,8 % eli kertovat hyvin, että nämä kuvaavat ominaisuuksia mainiosti. Attribuutit ovat selvästi jakautuneet kolmeen eri ryppääseen. Oikealla on 'marjainen' ja 'yleiseen laatuun' viittavia ominaisuuksia. Vasemmalla keskellä oli 'kitkeräisy', 'pistävyys' ja 'happamuus (haju)'. Vasemmalla alhaalla 'happamuus (maku)', 'fermentaatio' ja 'astringoiva'.

Nähdään Polka juomien olevan samalla alueella kuin 'alkoholinen haju' ja 'happamuus'. Honeoyet ovat vastakkaisilla puolilla kuvaajaa ja ovat näin ominaisuuksiltaan eroavia HS:llä ei ole oikein mitään sopivaa ominaisuutta, kun taas HT:n olevan ristikkäin 'kitkerän' kanssa ja lähellä 'yleinen laatu'. LT on 'pistävyys' kanssa lähekkäin. LS taas 'kukkaisuus' ja 'makeus' välissä.



Kuva 13 Pääkomponenttianalyysi kuvaaja ominaisuuksista ja näytteistä. Lataukset X-akselilla 18,8 % ja Y-akselilla 57,8 %. Näytteitä oli 6 ja ominaisuuksia 15.

### 7.3 Sokeri ja happo kaasukromatografia

Kaasukromatografialla tehty analyysi ajo sokerien ja happojen määrästä suorettiin uudelleen, koska sokereita oli niin paljon, ettei sisäisiä standardeja nähty. Näytteet ajettiin uudelleen ja toisellakaan kerralla saadut tulokset eivät olleet vertailu kelpoisia kirjallisuuteen, joten voidaan vain verrata näytteitä keskenään. Kromatografian mukaan glukoosia oli 19,9–35,7 g / 100 ml, sakkaroosia 10,9–44,9 g / 100 ml ja fruktoosia 40–62,2 g / 100 ml kohti. Hakala, oli omassa tutkimuksessaan määrittänyt sokerimääräksi 2–4 g / 100 ml kohti, joten nähdään tulosten olevan reilusti enemmän kuin kirjallisuudessa. Näytteet ajettiin uudelleen ja tulokset olivat vain hieman matalampia. Epäilimme näytteiden valmistuksessa olevan ongelmia, mutta emme olleet varmoja minkä takia (taulukko 8).

Happoja tutkiessa vertaillessa omenahappoa oli 0,20–0,36 g / 100 ml kohti. Nämä olivat lähellä Hakalan tutkimuksen tuloksia (0,2–0,5 g / 100 ml). Sitruunahappo oli kaikilla lajikkeilla lähellä toisiaan 1,24–1,36 g / 100 ml kohti. Tulokset ovat lähellä Hakalan (1997 ja 1998) tuloksia. Hakala oli saanut tulokseksi vuonna 1998  $1,17 \pm 0,1$  ja 1997  $1,58 \pm 0,14$ , joten tulokset ovat lähellä toisiaan. Jalostus ja ilmastonmuutos vaikuttavat mansikoihin näin pitkällä aikavälillä.

Vertaillessa kromatogrammeja nähdään selviä eroja, Lumotar mehussa on puolitoista kertaa enemmän omenahappoa kuin muissa. Kokonaissokerista myös nähdään Lumottarella olevan eniten sokeria, joka huomattiin myös Brix<sup>o</sup> avulla. Kokonaishapoissa Honeoyessa oli hieman vähemmän happoa. Ero tulee melkein ainoastaan kiinihapon määrästä. Kiinihappo koetaan astringoivana ja aikaisemmin nähtiin aistinvaraisesta arviosta Honeoyen tuntuvan eniten astringoivalta.

*Taulukko 8 Sokerien ja happojen määrä mehujuomissa lajikkeiden perusteella GC-FID analyysillä ennen fermentointia*

mg / 100 mL	Honeye	Polka	Lumotar
<b>Omenahappo</b>	0,235	0,200	0,358
<b>Tartarihappo (sisäinen standardi)</b>	0,5	0,5	0,5
<b>Sitruunahappo</b>	1,254	1,357	1,240
<b>Fruktoosi</b>	40,000	53,000	62,190
<b>Kiinihappo</b>	0,830	1,285	1,203
<b>Askorbiinihappo</b>	0,030	0,012	0,024
<b>Sorbitoli (sisäinen standardi)</b>	0,5	0,5	0,5
<b>Glukoosi</b>	19,90	28,81	35,68
<b>Sukroosi</b>	10,86	21,46	44,87
<b>Kokonaissokeri</b>	70,760	103,270	142,740
<b>Kokonaishappo</b>	2,349	2,855	2,826

## 7.4 Haihtuvien yhdisteiden GC-MS

Taulukossa 10. nähdään GC-MS data eroja pektiinillä käsitellyn, filteröidyn ja *Torulasporea delbrueckii* ja *Saccharomyces cerevisiae*. Nähdään useita kohtia, jossa näytteiden välillä ja eri valmistusvaiheissa on selviä eroja, kuten hiilidioksidi. Pektini käsitellyillä sitä oli 3,6 mg / 100 ml, mehulla 3,68 mg / 100 ml ja *Saccaromyches* 27 mg / 100 ml ja *Torulasporea* 25 mg / 100 ml. Juomilla oli moninkertainen määrä hiilidioksidia fermentoinnin jälkeen, joka oli haluttavaa yhdiste alkoholijuomissa. Lumotar juomalla oli eniten 31,5 mg / 100 ml ja Honeoyella vähiten 20,4 mg / 100 ml. Viineillä on yleensä 30–80 mg / 100 ml hiilidioksidia, joten tulos on hyvä.

Asetonia määrä laski juomissa hieman, Honeoye-lajikkeessa eniten (52,28 → 30,31) mg / 100 ml ja Lumottaressa (41,96 → 32,89) mg / 100 ml ja Polkassa (52,28 → 41,69) mg

/ 100 ml yhtä paljon. EFSA suosittelee asetonia olevan alle 10 mg / L, joten tämän kanssa voi olla ongelmia, ja tulisi tarkastella tulevissa erissä tarkasti.

Etanolia oli vähän tai ei ollenkaan ennen fermentointia ja fermentoinnin jälkeen huomattavia määriä odotettua enemmän. *Saccaromyces cerevisiae* muodosti enemmän 14,5–20,8 mg / 100 ml ja *Torulasporea delbrueckii* hieman vähemmän 11,6–18,9 mg / 100 ml. Tämä tiedettiin jo aikaisemmasta tutkimuksesta. Lajikkeiden välillä oli myös merkittävää eroa, Honeoyella oli vähiten etanolia 11,6–14,5 mg / 100 ml.

Etikkahappoa löytyi kaikista paitsi Polka lajikkeesta fermentoinnin jälkeen, joten voidaan olettaa, ettei sitä tunnistettu juomasta. Yhdistettä löytyi tasaisesti kaikista näytteistä, Lumottaresta hieman enemmän 15,6–20,1 mg / 100 ml:ssa. Honeoyessa hieman vähemmän 12–15,8 mg / 100 ml.

Metyyli-isovaleriaanihappo yhdistettä löytyi kaikista näytteistä ennen fermentointia. Honeoyessa selvästi enemmän 24 mg / 100 ml, Lumotar lajikkeessa on 15–17,9 mg / 100 ml ja Polkassa vähiten 6–8,1 mg / 100 ml. Yhdistettä ei löytynyt fermentoinnin jälkeen, joten voidaan päätellä sen olevan lähtöaine jollekin muulle yhdisteelle. Metyyli-isovaleriaanihappo on makean hajuinen esteri, omenainen, hedelmällinen ja anansmainen. Kyseinen yhdiste

Metyylibutyraatti löytyi kaikista lajikkeista ennen fermentointia. Fermentoinnin jälkeen sitä ei löydetty Honeoye-juomista. Metyylibutyraattia on todettu osa mansikan aromia jo ennen fermentointia. Se esiintyy yleisesti alkoholijuomissa, mutta nyt sen määrä väheni. Yhdisteen määrä väheni noin 66 %:iin fermentoinnin aikana kaikissa lajikkeissa. Tutkimuksessa mansikkaetikasta metyylibutyraattia löydettiin vain spontaanisti fermentoiduissa etikoissa, mutta GC-MS data kertoo sen olevan läsnä jo ennen fermentointia.

Etyyliasettaatti on yleinen viinin fermentoinnissa muodostuva esteri (kuva 9 F). Etyyliasettaatti koetaan nuorissa viineissä voimakkaana 'hedelmällisenä' hajuna. Liiallinen määrä etyyliasettaattia on viinivikana, aistinvaraisessa arvioinnissa arvioijat eivät huomanneet 'off-flavour' joten voidaan olettaa määrän olevan hyväksyttävissä rajoissa. *Saccharomyces* sisälsi 1,7–1,9 mg / ml ja *Torulasporea* 1,7–2,7 mg / ml. Etyyliasettaattia oli Honeoye-lajikkeella vähiten kummallakin hiivalla ja Lumottarella eniten. Kyseinen yhdiste muodostuu erityisesti *T. delbrueckii* hiivojen fermentoinnissa.

Heksyyliasetaattia löytyi kaikista fermentoiduista juomista paitsi Polka *T.delbrueckiista*. Polkassa 0,25 mg / ml. Honeoyella *Saccharomyces* enemmän 0,31 mg / ml ja *Torulaspورا* 0,14 mg / ml. Lumotar lajikkeella *Saccharomyces* 0,30 mg / ml ja *Torulaspورا* 0,22 mg / ml. Kyseinen yhdiste on tunnistettu makeutta vahvistavana yhdisteenä ja tuoksuu hedelmäiseltä.

Etyylibutyraatti on ananaksen tuoksuinen yhdiste (kuva 9 E.). Sitä löytyi vähän Lumotar ja Honeoye yhdisteitä valmistuksen kaikissa vaiheissa (0,18–0,48 mg / ml) ja Polka lajikkeella reilusti enemmän (1,47 mg/ml – 1,91 mg / ml).

Etyyli-heksanoaattia ei tunnistettu GC-MS analyysistä, mutta sen lähtöaineita kapronihappoa (kuva 9 J) oli runsaasti läsnä fermentoidussa juomassa. Valmista etyyli-heksanoaattia on melko varmasti, mutta sitä ei nyt tunnistettu. Etyyli-heksanoaatti muodostuu etanolista ja kapronihaposta kondensaatiolla. Kapronihappoa oli Honeoye lajikkeen fermentointi tuotteella eniten (ka. 59 mg / 100 ml), kaksinkertaisesti Polkaan (ka 38 mg / 100 ml) verrattaessa ja nelinkertainen Lumottareen (ka. 17 mg / 100 ml). Kyseinen yhdiste koetaan myös ananasmaisena hajuna.

Heksanolia löytyi kaikista näytteistä, sillä se on osa mansikan aromia. Sen määrä kasvoi fermentoinnin aikana kaikissa näytteissä. Heksanolia ei löytynyt pektiini Honeoye näytteessä, mutta mehussa ja fermentoinnin jälkeen oli. Kyseistä yhdistettä ei ole tunnistettu oikein pektiini Honeoyessa. Heksanoli moninkertaistui näytteissä. Honeoyessa 4,9 mg / 100 ml → 15–21,5 mg / 100 ml. Lumottaressa 9,7 mg / 100 ml mehussa ja fermentoidussa 45,2–56,5 mg / 100 ml:ssa. Polka mehussa 17,5 mg / 100 ml ja fermentoidussa 40,6–47,7 mg / 100 ml.

2-metyyli-butaanihappoa oli läsnä reilusti ennen fermentointia, Polkassa ennen ja jälkeen 20,7 mg – 25,1 mg / 100 ml ja 28,1–36,7 mg / 100 ml. Lumottaressa 8,3–11,3 mg / 100 ml ja 22,4–23,7 mg / 100 ml. Honeoyessa 8,3–18,4 mg / 100 ml ja 40,2–50,3 mg / 100 ml.

Isoamyylasetaattia muodostui *S. cerevisiae* hiivoja käytetyssä fermentoinnissa erittäin paljon enemmän. Noin kymmenkertainen määrä jokaisessa vertauksessa Polka lajikkeen hiivojen välillä 287 vs. 26 mg / 100 ml kohden. Kyseinen yhdiste on tunnettu sen banaanimaisesta hajusta ja se esiintyy myös kukkien hajuissa.

Diasetyyliä löytyi Polka ja Honeoye juomista ennen ja jälkeen fermentoinnin. Polkassa noin 61 mg / 100 ml kohti ja Honeoyessa 40 mg / 100 ml kohti. Lumotar lajikkeessa sen määrä ei muuttunut *T. delbrueckii* hiivassa 12 mg, mutta oli vain murto-osa *S. cerevisiae* vain 0,054 mg, joten todennäköisesti sitä ei ole tunnistettu oikein. Diasetyyli on joissain oluissa hyväksyttyä ja jopa haluttua yhdiste, mutta viinissä ei niinkään.

Taulukko 9 Näytteistä tunnistettujen haihtuvien yhdisteiden (nimi. engl.) Kovats retentio indeksi ja näytteiden keskiarvo

<b>Nimi</b>	<b>KA</b>
Acetone	814
Acetic Acid	826
Ethyl Acetate	885
Nonane	899
Ethanol	941
2,3-butanidione	974
Butanal 3 methyl	976
Methyl butanoate	983
Methyl Isobutyl Ketone	1001
Butanoic Acid 2-methyl methyl ester	1006
Isobutyl acetate	1010
Methyl isovalerate	1016
Butanoic Acid ethyl ester	1034
Isopropyl butyrate	1038
Butanoic Acid 2-methyl ethyl ester	1050
Butanoic Acid 3-methyl ethyl ester	1064
Acetic Acid butyl ester	1068
hexanal	1076
1-butanol 3 methyl acetate	1115
2-Pentano 4-methyl	1163
2-Heptanone	1176
Methyl Hexanoate	1179
Butyl butanoate	1209
Ethyl Hexanoate	1226
Butanoic Acid, 3-methylbuthyl ester	1236
Styrene	1252
Butanoic acid, 3-methylbuthyl ester	1259
Acetic Acid Hexyl ester	1266
Acetoin	1282
2 Heptanol	1312
2-hexen-1-ol acetate	1326
5-hepten2one-6-methyl	1332
1-Hexanol	1348
Trans-2-hexanol (hexan-2-ol)	1424
Butanoic Acid, 2-hexenyl ester	1448
Bezaldehyde	1530
Linalool	1544
3(2H)-furanone 4 methoxy-2,5-dimethyl	1600
Butanoic Acid 2 Methyl	1683
Hexanoic Acid	1849

Taulukko 10 Mansikkajuomista GC-MS-analysilla havaittujen haihtuvien yhdisteiden keskiarvopitoisuudet (mg/ml) (n=3)

mg / ml	Pektiini			Mehu			Saccaromyces			Torulaspora		
	Polka	Lumotar	Honeye	Polka	Lumotar	Honeye	Polka	Lumotar	Honeye	Polka	Lumotar	Honeye
Hiilidioksidi	0,03831	0,03381	0,03544	0,0403	0,0299	0,0403	0,2594	0,3546	0,1928	0,2666	0,2804	0,2141
Heptaani	0	0	0	0	0	0	0	0,1347	0,11217	0,35001	0,33081	0,2668
Asetoni	0,5376	0,3990	0,3486	0,5228	0,4196	0,5228	0,4175	0,3389	0,3528	0,4169	0,3289	0,3031
Etikkahappo	0,1036	0,2010	0,1596	0,0909	0,1732	0,0909	0,0000	0,1891	0,1581	0,0000	0,1562	0,1201
Etyyliasettaatti	0,1222	0,1456	0,2761	0,1471	0,1784	0,1471	1,8481	1,9266	1,6677	2,6019	2,6959	1,6838
Nonaani	0,0000	0,0000	0,0000	0,0187	0,0000	0,0281	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Etanoli	0,0494	0	0,086	0,05034	0	0,05034	17,2601	20,7854	14,5321	16,9781	18,8291	11,62
Diasetyyli	0,3546	0,14301	0,32129	0,30855	0,11728	0,30855	0,6182	0,00054	0,42719	0,60311	0,12203	0,38816
3-metyylibutaani	0	0	0	0	0	1,71128	0	0,46294	0	0	0,33523	0
Metyylibutyraatti	0,94236	0,4982	0,04095	1,14085	0,50515	0,14061	0,67831	0,3387	0	0,67254	0,33871	0
Metyyli-isobutyliketoni	0,16845	0,22284	0,0254	0,14061	0,23014	0	0,15258	0,25023	0	0,11246	0,17879	0
metyyli-2-metyyli-butaraatt	0,14534	0,05268	0	0,20612	0,05386	0	0	0,01644	0	0	0,01791	0
Isobutyliasettaatti	0	0	0	0	0	0,20612	0	0	0,13472	0	0,01436	0
Metyyli-isovaleraanahappo	0,06004	0,15006	0	0,08101	0,17975	0,24304	0	0	0	0	0	0
Etyylibutyraatti	1,53317	0,37196	0,20187	1,91298	0,3476	1,91298	1,45246	0,48265	0,29056	1,47551	0,38416	0,18668
Isopropyli butaanihappo	0,11409	0,02601	0	0,1582	0,02496	0	0,21343	0	0,0563	0,53234	0,08688	0
Etyyli-2-metyyli-butaraatti	0,1136	0,04137	0	0,1443	0,04618	0,1582	0	0	0	0	0	0
Etyyli-3-metyyli-butaraatti	0,28901	0,14813	0,02891	0,36528	0,16799	0,1443	0,21359	0,12875	0	0,20544	0,12373	0
N-butyliasettaatti	0,01706	0	0,06285	0	0	0,36528	0	0,0126	0	0	0	0
Heksanaali	0,04135	0,06906	0	0,05953	0,04901	0,05953	0	0	0	0	0	0
1-butanooli-3-metyyli-asetta	0,03094	0,02496	0,05553	0,04665	0,02632	0,04665	2,66861	3,06222	5,12058	0,26048	0,27961	0,19327
Metyyli-isobutyliketoni	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2-heptanoni	0,0885	0,02768	0,07304	0,09273	0,02594	0,09273	0,16015	0	0,2154	0	0	0
Metyyli-hexanoaatti	0,51457	0,15719	0,38119	0,2361	0,0348	0,2361	2,92563	0	0,17914	0,20441	0	0,14357
Butylibutyraatti	0,03507	0	0	0,07171	0	0	0	0	0	0	0	0
Etyyliheksanoaatti	0,28552	0,03315	0,11704	0,57189	0,01977	0,07171	0	2,58014	4,36501	3,03024	1,34073	2,08674
3-metyyli butylibutyraatti	0,02777	0	0	0,04601	0	0	0	0	0	0	0	0
Styreeni	0,99645	1,26909	0	0,36233	0,27015	0	0	0,12885	0	2,47164	3,52698	0,21247
Butanoic acid, 3-methylbut	0,06107	0	0	0,04973	0	0	0	0	0	0	0	0
Heksyliasettaatti	0,0391	0	0,08665	0,08734	0	0,57189	0,25254	0,29736	0,30986	0	0,2215	0,13771
Asetoiini	0,01645	0	0	0	0	0,06902	0	0	0	0	0	0
2 heptanoli	0,06874	0	0,03574	0,05033	0	0,5435	0	0	0	0	0	0,08514
trans-2-heksenyliasettaatti	0,03384	0,03492	0,08177	0,08305	0,04078	0	0	0	0,14313	0	0	0,10621
Sulkatone	0,01212	0	0,04607	0,01329	0,00518	0	0	0	0	0	0	0
1 hexanooli	0,19164	0,12254	0	0,17543	0,09727	0,04973	0,47722	0,56457	0,21528	0,40645	0,45252	0,14948
Pentadekaani	0	0	0	0	0,05358	0	0	0	0	0	0	0
Trans-2-hekseeni	0,06274	0,05309	0	0,06892	0	0	0	0	0	0	0	0
2-metyyli-heksyliesteri but	0,01764	0	0,02466	0,0516	0	0	0	0	0	0	0	0
Bentsaldehydi	0,0351	0,06145	0	0	0,02539	0	0	0	0	0,1097	0,272	0,08718
Linaloli	0,2908	0,38647	1,10233	0,26221	0,35979	0,08734	0,70792	0,86964	2,90644	0,74	0,71747	2,00411
3(2H)-Furanone 4 methoxy-	0,0657	0,11426	0,02706	0,0558	0,09952	0,05033	0,13462	0,34685	0	0,13923	0,31862	0
2-metyylibutaanihappo	0,25109	0,11335	0,184	0,20654	0,08287	0,08305	0,36684	0,22377	0,50284	0,28131	0,23727	0,40237
Oktadekaani	0	0	0	0	0	0	0,00331	0	0	0	0	0
Kapronihappo	0,26212	0,10623	0,27941	0,21057	0,07593	0,01993	0,3989	0,1874	0,73228	0,36296	0,15028	0,45033
Eikosaani	0	0	0	0	0	0	0	0,13317	0	0,14161	0,14926	0
1,6,10-doecatrien-3-ol, 3,6,	0,33578	0,17933	0,10436	0,57705	0,20047	0,17543	0,28061	0,23651	0,25714	0,24893	0,2218	0,13815

## 8 Yhteenveto

Lajikkeiden välillä oli selviä eroja matala-alkoholisten juomien valmistuksessa. Tämän tutkimuksen mukaan Honeoye olisi paras vaihtoehto juomille korkean sokeripitoisuuden takia ennen fermentointia, punaisemman värin ja kukkaisuuden perusteella. Kyseisellä lajikkeella oli myös vähemmän 'vääränmakuisuutta'. 'Vääränmakuisuus' tässä tarkoitti makuja, joita ei haettu tässä tutkimuksessa kuten voimakas hiivamaisuus tai muut kuin mansikan maut. Kyseiset maut voivat kuitenkin olla haluttuja eri kuluttajakunnalla ja juomien valmistuksessa.

Kaikki mansikat olivat kuitenkin mahdollisia käyttökohteita matala-alkoholisten juomien valmistuksessa. Hiivojen välillä oli selkeitä eroja, jossa *T. delbrueckii* oli parempi vaihtoehto matala-alkoholisten juomien valmistukseen sen pienemmän etanolin valmistuksen takia sekä paremman haju ja maku profiilin vuoksi. Kappaleessa 5 puhuttiin *T. delbrueckii* olevan nopeampi fermentoimaan kuin *S. cerevisiae*, mutta sitä ei nähty tässä työssä, sillä fermentoinnit tapahtuivat yhtä nopeasti.

Parannusehdotuksia ensi töihin olisi käyttää useampaa lajia tai eri mansikan kypsäysasteita. Juomaa tulisi myös valmistaa suurempi erä ja kattavampi raati. Toinen mahdollinen tapa olisi keskittyä selvästi enemmän haihtuviin yhdisteisiin ja merkittävästi tarkempaan tarkasteluun GC-MS-analyyseistä.

Työssä nähtiin mansikan olevan hyvä raaka-aine juomien valmistukseen ja mahdollinen tapa käyttää ei halutut vahingoittuneet mansikat. Mansikka- ja hiivalajikkeita on monia ja tämän takia on hyvä löytää sopivat yhdistelmät ennen valmistuksen aloittamista. Lisää tutkimalla matala-alkoholisia mansikkajuomia voidaan avata uusi osa kuluttajien käyttöön ja mahdollisia 'terveellisempiä' alkoholivaihtoehtoja.

## Lähteet

- Aaby, K.; Ekeberg, D.; Skrede, G. Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria x Ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (11), 4395–4406. <https://doi.org/10.1021/jf0702592>.
- Aaby, K.; Mazur, S.; Nes, A.; Skrede, G. Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch.) Fruits: Composition in 27 Cultivars and Changes during Ripening. *Food Chem.* **2012**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.037>.
- Afrin S.,Gasparrini M., Forbes-Hernandez T., Reboredo-Rodriguez P., Mezzetti B., Varela-López A., Giampieri F., Battino M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2016), 4435-4449, 64(22)
- Bely, M.; Stoeckle, P.; Masneuf-Pomarède, I.; Dubourdiou, D. Impact of Mixed *Torulaspora Delbrueckii*-*Saccharomyces Cerevisiae* Culture on High-Sugar Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>.
- Buendia, B., Gil, M. I., Tudela, J. A., Gady, A. L., Medina, J. J., Soria, C., et al. (2010).HPLC–MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15strawberry cultivars.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7),3916–3926
- Chen, K.; Escott, C.; Loira, I.; del Fresno, J. M.; Morata, A.;Tsfaye, W.; Calderon, F.; Suárez-Lepe, J. A.; Han, S.; Benito, S. Useof Non-SaccharomycesYeasts and Oenological Tannin in RedWinemaking: Influence on Colour, Aroma and Sensorial Propertiesof Young Wines.*Food Microbiol.*2018,69,51–63
- Chung, M. J.; Lee, S. H.; Sung, N. J. Inhibitory Effect of Whole Strawberries, Garlic Juice or Kale Juice on Endogenous Formation of N-Nitrosodimethylamine in Humans. *Cancer Lett.* **2002**. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00076-9).
- Ciani, M.; Comitini, F. Use of Non-SaccharomycesYeasts inRed Winemaking. InRed Wine Technology; Elsevier, 2019; pp 51–68.DOI: 10.1016/B978-0-12-814399-5.00004-9.
- Enomoto H., Sato K., Miyamoto K., Ohtsuka A., Yamane H., Distribution Analysis of Anthocyanins, Sugars, and Organic Acids in Strawberry Fruits Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Imaging Mass Spectrometry *J. Agric. Food Chem.* 2018, 66, 4958–4965 Article
- Espín, J. C.; González-Barrio, R.; Cerdá, B.; López-Bote, C.; Rey, A. I.; Tomás-Barberán, F. A. Iberian Pig as a Model to Clarify Obscure Points in the Bioavailability and Metabolism of Ellagitannins in Humans. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (25), 10476–10485. <https://doi.org/10.1021/jf0723864>.
- Edirisinghe, I.; Banaszewski, K.; Cappozzo, J.; Sandhya, K.; Ellis, C. L.; Tadapaneni, R.; Kappagoda, C. T.; Burton-Freeman, B. M. Strawberry anthocyanin and its association with postprandial inflammation and insulin. *Br. J. Nutr.* 2011, 106, 913–922.
- Ellis, C. L.; Edirisinghe, I.; Kappagoda, T.; Burton-Freeman, B. Attenuation of meal-induced inflammatory and thrombotic responses in overweight men and women after 6-week daily strawberry (*Fragaria*) intake. *J. Atheroscler. Thromb.* 2011, 18, 318–327.
- Giampieri, F.; Alvarez-Suarez, J. M.; Battino, M. Strawberry and Human Health: Effects beyond Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society May 7, 2014, pp 3867–3876. <https://doi.org/10.1021/jf405455n>.
- Giampieri, F.; Tulipani, S.; Alvarez-Suarez, J. M.; Quiles, J. L.; Mezzetti, B.; Battino, M. The Strawberry: Composition, Nutritional Quality, and Impact on Human Health. *Nutrition*. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>.
- He, W., Liu, S., Heponiemi, P., Heinonen, M., Marsol-Vall, A., Ma, X., et al. (2020). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* strains on chemical composition and sensory quality of ciders made from Finnish apple cultivars. *Food Chemistry*. , Article 128833. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128833>

- Heard, G. M.; Fleet, G. H. *Growth of Natural Yeast Flora during the Fermentation of Inoculated Wines*; 1985; Vol. 50.
- Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J. O., Dommès, J., & Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8 596–8603.
- Mattila P, Kumpulainen J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J Agric Food Chem* 2002;50:3660–7.
- McDougall, G. J.; Ross, H. A.; Ikeji, M.; Stewart, D. Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Grown in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (9), 3016–3023. <https://doi.org/10.1021/jf073469n>.
- McGhie, T. K.; Walton, M. C. The Bioavailability and Absorption of Anthocyanins: Towards a Better Understanding. *Molecular Nutrition and Food Research*. June 2007, pp 702–713. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700092>.
- Medina, K.; Boido, E.; Dellacassa, E.; Carrau, F. Effects of Non-Saccharomyces Yeasts on Color, Anthocyanin, and Anthocyanin-Derived Pigments of Tannat Grapes during Fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 2018, 69(2), 148–156.
- Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA, Jacobs DR Jr. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:895–909
- Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:631–6.
- Piljac-Žegarac, J.; Šamec, D. Antioxidant Stability of Small Fruits in Postharvest Storage at Room and Refrigerator Temperatures. *Food Res. Int.* **2011**. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.039>.
- Sesso HD, Gaziano JM, Jenkins DJ, Buring JE. Strawberry intake, lipids, C-reactive protein, and the risk of cardiovascular disease in women. *J Am Coll Nutr* 2007;26:303–10.
- Schwieterman, M. L.; Colquhoun, T. A.; Jaworski, E. A.; Bartoshuk, L. M.; Gilbert, J. L.; Tieman, D. M.; Odabasi, A. Z.; Moskowitz, H. R.; Folta, K. M.; Klee, H. J.; et al. Strawberry Flavor: Diverse Chemical Compositions, a Seasonal Influence, and Effects on Sensory Perception. *PLoS One* **2014**, 9 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088446>.
- Stoner, G. D.; Wang, L. S.; Casto, B. C. Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis* 2008, 29, 1665–1674.
- Wang, S. Y.; Millner, P. Effect of Different Cultural Systems on Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Fruit Quality of Strawberries (*Fragaria × Aranassa* Duch.). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (20), 9651–9657. <https://doi.org/10.1021/jf9020575>.
- Wang, L. S.; Kuo, C. T.; Cho, S J.; Seguin, C.; Siddiqui, J.; Stoner, K.; Weng, Y. I.; Huang, T. H.; Tichelaar, J.; Yearsley, M.; Stoner, G. D.; Huang, Y. W. Black raspberry-derived anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells. *Nutr. Cancer* 2013, 65, 118–125. [https://stat.luke.fi/en/horticultural-statistics-2018\\_en](https://stat.luke.fi/en/horticultural-statistics-2018_en) Haettu 2020.01.13
- Hakala, Mari et al. “Determination of Strawberry Volatiles with Low Resolution Gas Phase FT–IR Analyser.” *European Food Research and Technology* 212.4 (2001): 505–510. Web.
- Ulrich, D.; Kecke, S.; Olbricht, K. What Do We Know about the Chemistry of Strawberry Aroma? *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66 (13), 3291–3301. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01115>.
- Feng, Y.; Liu, M.; Ouyang, Y.; Zhao, X.; Ju, Y.; Fang, Y. Comparative Study of Aromatic Compounds in Fruit Wines from Raspberry, Strawberry, and Mulberry in Central Shaanxi Area. *Food Nutr. Res.* **2015**, 59. <https://doi.org/10.3402/fnr.v59.29290>.

- Cannon, R. J.; Agyemang, D.; Curto, N. L.; Yusuf, A.; Chen, M.Z.; Janczuk, A. J. In-depth analysis of Ciflorette strawberries (*Fragaria x ananassa* 'Ciflorette') by multidimensional gas chromatography and gas chromatography-olfactometry. *Flavour Fragrance J.* 2015, 30, 302–319.
- da Silva, F. L.; Escribano-Bailón, M. T.; Pérez Alonso, J. J.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. Anthocyanin Pigments in Strawberry. *LWT - Food Sci. Technol.* **2007**, 40 (2), 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>.
- Morazzoni, P., Livio, S., Scilingo, A., Malandrino, S., Vaccini, M. *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides pharmacokinetics in rats, *Drug Res.* 1991, 41, 128–131.
- Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M., Tominaga, S., et al., Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms, *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1546–1551.
- Wending Chen, Caiyun Xie, Qianqian He, Jianxia Sun, Weibin Bai, Improvement in color expression and antioxidant activity of strawberry juice fermented with lactic acid bacteria: A phenolic-based research, *Food Chemistry: X*, Volume 17, 30 March 2023, 100535, <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100535>