



Marjamehustamojen sivuvirtana muodostuvan marjapuristeen fenoliset uuteaineet

Riina Honkaniemi
Kandidaatintutkielma
Kemian tutkinto-ohjelma
Oulun yliopisto
2022

TIIVISTELMÄ

Marjoja hyödynnetään ruoanlaitossa, säilönnässä muun muassa mehuina ja hilloina sekä syödään sellaisenaan. Marjamehustamoista sivuvirtana muodostuvaa marjapuristetta on jopa 20 % alkuperäisten marjojen painosta, joka päättyy yleensä jätteeseen. Marjapuristeeseen jää kuitenkin vielä ihmiselle terveyttä edistäviä yhdisteitä, kuten polyfenoleita. Ne ovat kasveilla toissijaisia aineenvaihduntatuotteita, joihin kuuluu muun muassa väripigmentit eli antosyaanit. Terveydelliset vaikutukset johtuvat näiden antioksidanttisuudesta. Tutkielma perehtyy suomalaisista marjoista mustikkaan, mustaviinimarjaan, tyrniin ja hillaan, marjapuristeen prosessointiin, fenolisten uuteaineiden kokonaismääriin, ja antioksidanttiseen kapasiteettiin.

Marjapuristeen prosessi lähtee esikäsitteystä, jossa puriste säilytetään jäädyttämällä, sulatetaan tai kuivataan suoraan kylmäkuivauksen avulla ja hienonnetaan ennen uuttoa. Polyfenolien uutossa voidaan käyttää tavallista kiinteä-nesteuuttoa tai vaihtoehtoisesti ultraääniavustettua tai paineistettua kuumavesiuuttoa. Liuottimina käytetään usein vettä ja jotain alkoholia, kuten metanolia tai etanolia. Uute analysoidaan tietyillä analyysimenetelmillä riippuen mitä halutaan tarkastella.

Mustikka, mustaviinimarja, tyrni ja hilla ovat sekä ulkonäöllisesti että kemiallisesti erilaisia marjoja. Määritykset osoittivat mustikalla ja mustaviinimarjalla olevan suurempi fenolinen kokonaismäärä ja antioksidanttinen kapasiteetti kuin muilla. Eroja löytyy myös yhdisteistä, joita kyseisillä marjoilla on eniten. Tarkoilla fenolisten uuteaineiden määrityksillä saadaan tietää, ovatko uuteaineet soveliaita käytettäväksi esimerkiksi farmaseuttisiin tuotteisiin. Marjapuristeesta uutettujen aineiden lisäksi myös itse marjapuristetta voidaan käyttää esimerkiksi raaka-aineena terveysvaikutteisissa elintarvikkeissa.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	5
2. MARJAPURISTEEN SISÄLTÄMIEN UUTEAINEIDEN ERISTÄMINEN JA ANALYSOINTI	6
2.1. Prosessikaavio	6
2.1.1. Esikäsittely.....	7
2.1.2. Uutto	8
2.1.3. Analyysimenetelmiä	10
2.2. Polyfenolit, antosyaanit ja antioksidanttisuus	11
3. MARJAT	12
3.1. Marjapuristeen fenolinen koostumus	12
3.2. Mustikka	13
3.3. Mustaviinimarja	14
3.4. Tyrni	15
3.5. Hilla	17
3.6. Marjojen vertailua	17
4. YHTEENVETO	19
5. VIITTEET	20

LYHENNELUETTELO

Lyhenne	Selite
AAE	Askorbiinihappo ekvivalentit (<i>Ascorbic acid equivalents</i>)
ABTS	(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
DM	Kuiva massa (<i>Dry mass</i>)
DPPH	2,2-difenyyl-1-pikryylihydratsyyli (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
DW	Kuiva paino (<i>Dry weight</i>)
FRAP	(<i>Ferric reducing activity power</i>)
FW	Tuore paino (<i>Fresh weight</i>)
GAE	Gallushappo ekvivalentti (<i>Gallic acid equivalent</i>)
GA	Gallushappo (<i>Gallic acid</i>)
HPLC-DAD	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-diodirividetektori (<i>High performance liquid chromatography-diode-array detection</i>)
ORAC	Happiradikaalin absorbanssikyky (<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>)
TA	Antosyaaninen kokonaismäärä (<i>Total anthocyanins</i>)
TAE	Tanniinihappo ekvivalentit (<i>Tannic acid equivalents</i>)
TE	Trolox ekvivalentti (<i>Trolox equivalent</i>)
TP	Fenolinen kokonaismäärä (<i>Total polyphenol</i>)
TRAP	(<i>Total radical trapping antioxidant parameter</i>)
UHPLC-MS	Ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia-massaspektrometri (<i>Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
WM	Märkä massa (<i>wet mass</i>)

1. JOHDANTO

Marjat kuuluvat yhtenä osana pohjoismaiseen ja suomalaiseen ruokakulttuuriin. Ne kasvavat luonnossamme, antavat elantoa, ravintoa ja niitä kerätessä jopa iloa ja kuntoa. Marjoja hyödynnetään ruoanlaitossa, säilönnässä muun muassa mehuina ja hilloina sekä syödään sellaisenaan. Vanhassa kansanperinteessä on tiedetty marjojen syönnin positiivisista terveysvaikutuksista. Tälle on saatu tieteellistä näyttöä kemiallisen tutkimuksen ja koostumuksen selvittämisen avulla.

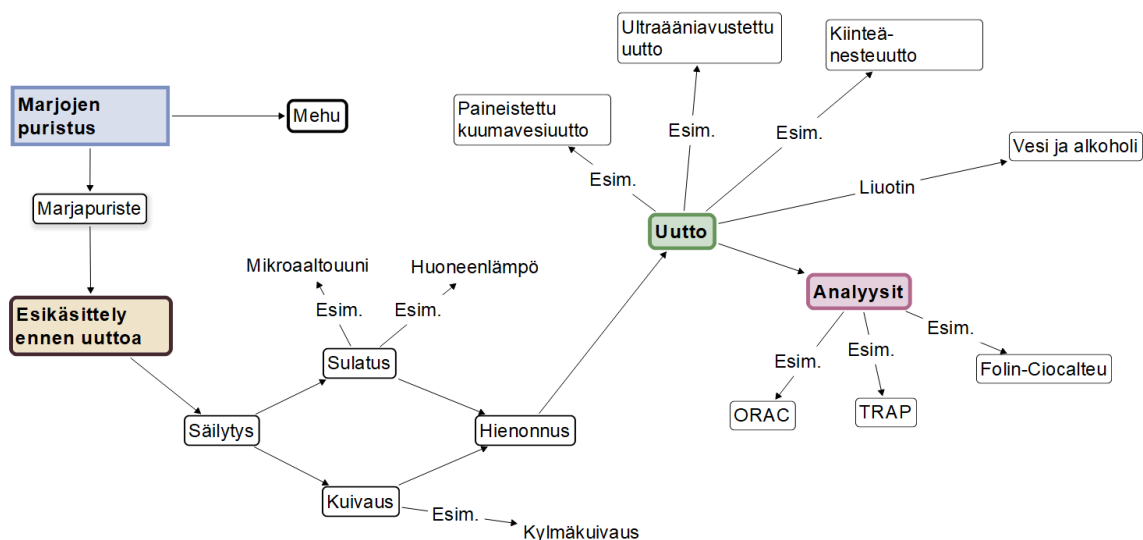
Mehustuksessa erotetaan puristamalla marjasta neste ja muu kiinteä marja, jota kutsutaan marjapuristeeksi. Mehu päätyy kuluttajille, mutta puriste joutuu yleensä jätteeseen. Alkuperäisestä marjojen painosta jätettä voi olla jopa 20–30 %.¹ Puriste voi myös päätyä eläimille tai kompostoitavaksi. Mehun joukkoon päätyy osa marjan vesiliukoisista yhdisteistä, mutta marjapuristeeseen jää vielä terveyttä edistäviä yhdisteitä, kuten polyfenoleita. Polyfenolit ovat olleet tiiviin tutkimuksen kohteena johtuen niiden bioaktiivisista ominaisuuksista. Osalla näistä yhdisteistä on antioksidanttisia ominaisuuksia. Polyfenolit sijaitsevat kokonaisuudessaan marjassa suurimmaksi osaksi kuoressa ja siemenissä, joten suurin osa jää marjapuristeeseen.¹

Tässä tutkielmassa tarkastellaan Suomessa kasvavista marjoista mustikkaa, mustaviinimarjaa, tyrniä ja hillaa, ja niiden prosessointia puristamisesta analyysiin. Tarkastelun kohteena on fenolien tai polyfenolien ja antosyaanien määrä marjapuristeessa, ja antioksidanttisuus. Lisäksi tutkitaan mitä polyfenolisia yhdisteitä marjoissa on eniten. Polyfenolien tutkimisella pyritään selvittämään, ovatko uuteaineet tarpeeksi soveliaita ja laadukkaita käytettäväksi muun muassa terveysvaikutteisiin elintarvikkeisiin ja farmaseuttisiin tuotteisiin.

2. MARJAPURISTEEN SISÄLTÄMIEN UUTEAINEIDEN ERISTÄMINEN JA ANALYSOINTI

2.1. Prosessikaavio

Marjapuriste saadaan mehustamosta, jossa se erotetaan mehusta. Marjapuriste käy ennen uuttoa esikäsittelyprosessin, johon voi kuulua useampi vaihe. Kuvassa 1 esitellään prosessikaavio mahdollisista vaiheista. Ellei puriste pääse suoraan puristamisen jälkeen hienonnuksen ja uuttoon, seuraava vaihe puristamisen jälkeen on säilytys, joka tässä tarkoittaa jäädytystä. Jäätynyt puriste voi mennä hienonnuksen kuivauksen tai sulatuksen kautta. Kuivaukseen voidaan käyttää kylmäkuivausta ja sulatukseen esimerkiksi sulatusta mikroaaltouunissa. Hienonnuksen jälkeen tulee uutto, joka voidaan suorittaa eri menetelmiä ja uuttoluottimia käyttäen. Kun halutut yhdisteet on saatu uutettua, analysoidaan ne sopivalla menetelmällä. Fenolista kokonaismäärää voidaan määrittää esimerkiksi Folin-Ciocalteu menetelmällä ja antioksidanttista kapasiteettia esimerkiksi happiradikaalin absorbanssikykymenetelmällä (ORAC) ja TRAP-menetelmällä.



Kuva 1. Marjapuristeen käsittelyn ja analysoinnin prosessikaavio

2.1.1. Esikäsitely

Esikäsitelyn ensimmäinen vaihe on säilytys, jonka tarkoituksena on säilyttää marjapuriste hyvässä kunnossa siihen asti, kunnes se pääsee jatkoprosessiin kohti analyysijä. Puriste on jäädytettävä, jos se ei pääse suoraan puristuksen jälkeen prosessoitavaksi. Jäädytys tapahtuu -20 - -40 °C:ssa¹, yleisimmin kuitenkin -20°C:ssa taulukon 1 mukaan. Jäädytyksen tarkoitus on pitää marjapuristeen sisältämät ravintoaineet mahdollisimman tuoreen veroisina.

Jäädytyksen jälkeen jäinen marjapuriste on joko sulatettava tai kuivattava. Jos puristetta ei ole jäädytetty, sulatusta ei tarvitse, mutta kuivaus voidaan vielä tehdä. Taulukossa 1 mainitaan kaksi sulatustapaa, sulatus mikroaaltouunissa² tai huoneenlämmössä.³ Erillistä kuivausta ei mainittu sulatuksen jälkeen. Yleisin mainittu tapa kuivaamiselle oli kylmäkuivaus. Siinä jäätyneestä marjasta tai marjapuristeesta vesi poistetaan sublimoimalla matalan paineen ja lämpötilan avulla. Tämä tarkoittaa sitä, ettei erillistä sulatusta tarvita. Muita kuivausmenetelmiä ovat muun muassa kuivaus kiertoilmauunissa, alhaisen lämpötilan vakuumikuivaus ja infrapunakuivaus.¹ Näistä tavoista kuivausta kiertoilmauunissa käytettiin Taglianin tutkimusryhmän⁴ tutkimuksessa, jossa käytetty lämpötila oli +45 °C ja marjapuriste kuivattiin 13 g/100 g kosteuteen.

Marjapuristeen esikäsitelyssä on otettava huomioon käsittelytapojen ja -lämpötilojen vaikutukset bioaktiivisiin komponentteihin, kuten polyfenoleihin. Tutkittavat polyfenolit ovat lämpöherkkiä⁴, jonka takia kylmäkuivaus on parhaimmista tavoista kuivata marjapuriste. Kun käytetään matalia lämpötiloja ja painetta, ei ole nestemäistä vettä, happea ja korkeaa lämpöä saatavilla, jotka kiihdyttävät bioaktiivisten komponenttien hajoamista. Tällöin suurin osa hajoamisreaktioista siis vähenee tai loppuu kokonaan.⁵ Esimerkiksi yli 180 °C lämpö vähentää antioksidanttista kapasiteettia.⁴

Esikäsitelyreitti marjasta uuttoon on erilainen riippuen tutkimuksesta. Joissakin tapauksissa marjapuriste tai marjat saadaan suoraan analysoitavaksi, jolloin niiden jäädytystä ei tarvita. Materiaali voi mennä hienonnuksen joko kuivana tai märkänä riippuen siitä, onko kuivausta tehty, ja uuttoon mukaan otettava partikkelikoko voidaan määrätä siivilöinnillä.

Taulukko 1. Mustikan, mustaviinimarjan, tyrnin ja hillan esikäsittelyssä käytettyjä olosuhteita.

	SÄILYTYS	SULATUS	KUIVAUS	HIENONNUS JA PARTIKKELIKOKO	PURISTE?
MUSTIKKA ¹	Jäädytys -20 - - 40 °C	-	Kylmäkuivaus	Kyllä	Kyllä
MUSTIKKA ⁶	-20 °C	-	Kylmäkuivaus -45 °C	Kyllä	Kyllä
MUSTIKKA ⁴	-	-	Kuivattiin +45 °C 13 g/100 g kosteuteen	Kyllä 1 mm	Kyllä
MUSTIKKA ⁷	-	-	-	-	Kyllä
MUSTIKKA ⁸	-20 °C	-	-	-	Kyllä
MUSTAVIINIMARJA ¹	-	-	Kylmäkuivaus	Kyllä	Kyllä
MUSTAVIINIMARJA ²	-20 °C	Kyllä (Mikroaaltouunissa)	-	-	Kyllä
MUSTAVIINIMARJA ⁹	-20 °C	Kyllä (Mikroaaltouunissa)	-	Kyllä	Ei
MUSTAVIINIMARJA ¹⁰	-20 °C	-	Kylmäkuivaus	0,5 mm	Kyllä
TYRNI ¹¹	Jäädytys	-	Kylmäkuivaus	0,5 mm	Kyllä
TYRNI ¹²	-	-	-	Kyllä	Ei
TYRNI ¹³	-	-	Kyllä	Kyllä	Ei
TYRNI ²	-20 °C	Kyllä (Mikroaaltouunissa)	-	-	Kyllä
HILLA ¹⁴	-	-	Kylmäkuivaus	-	Ei
HILLA ³	-20 °C	Kyllä (Huoneenlämmössä)	-	Kyllä	Ei
HILLA ¹⁵	Jäädytys	-	-	Kyllä	Ei

2.1.2. Uutto

Uuttoon menee esikäsittelystä joko hienonnettu märkä tai kuiva marjapuriste tai kokonainen marja. Uuton kannalta on tärkeää, että materiaali hienonnetaan pienempään partikkelikoon. Jossain tapauksissa hienonnettu materiaali vielä siivilöidään. Käytettyjä partikkelikokoja olivat 1 mm ja 0,5 mm.^{4,10,11} Mitä hienompaa materiaalia uutossa käytetään, sitä tehokkaampi uutto saadaan. Polyfenolien saantoon vaikuttaa myös se, mitä uuttotapaa käytetään. Kiinteä-nesteuuton lisäksi on olemassa uudenlaisia uuttomenetelmiä kuten paineistettu kuumavesiuutto ja ultraääniavustettu uutto.

Kiinteä-nesteuutto on yleisin uuttomenetelmä ja sitä käytetäänkin vertailukohteena, kun tutkitaan muita uuttomenetelmiä. Siinä siis kiinteästä materiaalista uutetaan polyfenolit nestemäiseen uuttoliuottimeen. Uutossa on

otettava huomioon esimerkiksi käytetty lämpötila ja uuttoliuotin, jotka ovat sopivia polyfenoleille. Soxhlet-laitetta käyttäessä varsinkin liuotinta lämmitettäessä voi lämpö vaikuttaa polyfenoleihin.¹⁶

Paineistettu kuumavesiuuton tarkoituksena on käyttää vettä liuottimena ja painetta. Painetta käytetään, jotta saadaan korkeassa lämpötilassa vesi pysymään nestemäisessä muodossa uuton ajan. Veden ominaisuudet muuttuvat näissä olosuhteissa. Tämä tarkoittaa esimerkiksi sitä, että polarisaatio ja tiheys ovat alhaisemmat. Lisäksi veden pintajännitys ja viskositeetti laskee, ja diffuusiokyky nousee. Nämä muutokset sallivat nopeamman erotuksen. Molekyylien väliset vuorovaikutukset vähenevät korkean lämpötilan vaikutuksesta, eli analyyyti irtautuu helpommin näytteestä liuottimeen. Tärkeää on kuitenkin tietää analyyttien optimaalinen uuttolämpötila, sillä lämpöherkät yhdisteet voivat hajota. Esimerkiksi flavonoideille parhaimmat olosuhteet paineistetussa kuumavesiuutossa ovat 3,0–10,3 MPa paineessa, 85–126 °C lämpötilassa ja 10–30 min uuttoajassa.¹⁷ Paineistetussa kuumavesiuutossa ei aina käytetä vettä, jolloin sitä kutsutaan paineistetuksi nesteuutoksi. Esimerkiksi Dienaite tutkimusryhmineen¹¹ käytti liuottimena etanolia. Paineistetun neste/kuumavesiuuton hyviä puolia ovat mahdollisuus käyttää vaarattomampia liuottimia ja vähentää uuttoaikaa.¹⁷

Toinen uudenlainen uuttomenetelmä on ultraääniavustettu uutto. Ultraääni-aallot aiheuttavat kiinteä-nesteuutossa pieniä ja nopeasti luhistuvia kuplia, jotka synnyttävät shokkiaaltoja. Nämä shokkiaallot rikkovat soluseiniä vähentäen lopulta näytteen hiukkaskokoa, jolloin liuotin tunkeutuu tähän paremmin ja irrottaa halutun aineen näytteestä. Ultraääniavustettu uutto on sopiva uuttotapa, kun halutaan uuttaa lämpöherkkiä yhdisteitä, sillä tämä tapa ei vaadi suuria lämpötiloja. Tähän uuttotapaan tarvitaan lisäksi vähemmän liuotinta ja uuttoaikaa.¹⁸

Polyfenolit liukenevat veteen ja alkoholiin, joten niitä käytetään uuttoliuottimina. Voidaan käyttää pelkästään vettä tai alkoholia tai niiden sekoitusta, kuten taulukosta 2 voidaan havaita. Taulukosta 2 nähdään lisäksi etanolin ja metanolin olevan suosittuja liuottimia. Mahdollisuutena on myös lisätä jotain happoa, kuten esimerkiksi etaanihappoa tai suolahappoa liuosseoksen.

Taulukko 2. Uuttotavat ja niissä käytetyt liuottimet

Uuttotapa	Liuotin
Kiinteä-nesteeuutto	80 % metanoli, 0,05 % etaanihappoa ⁷ HCl _{conc} , metanoli, vesi ⁴ etanoli ^{2,8} metanoli, suolahappo ⁹ 80 % metanoli ¹⁴ , 70 % metanoli ³ 0,2 % etaanihappo ¹⁵
Paineistettu kuumavesiuutto	vesi, etanoli, etaanihappo ¹⁰ vesi, etanoli ¹¹
Ultraääniavustettu uutto	etanoli, metanoli, metaanihappo, trifluorietaanihappo ⁶ metanoli ¹²

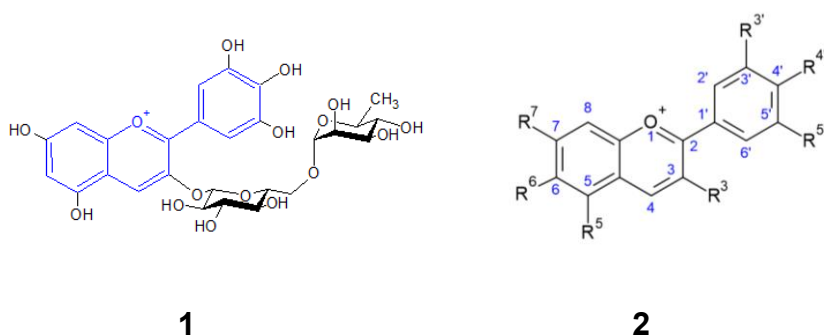
2.1.3. Analyysimenetelmiä

Folin-Ciocalteu on usein mainittu ja hyväksi todettu menetelmä, kun halutaan tietää fenolinen kokonaismäärä näytteessä. Pelkästään antosyaanien kokonaismäärän määrittämiseen on käytetty pH differentiaalimenetelmää.¹ Näille molemmille käytetään myös korkean erotuskyvyn nestekromatografia-didirividetektoria (HPLC-DAD), joka toimii myös yksittäisten yhdisteiden identifiointiin.¹⁰ Toinen tapa tunnistaa yhdisteitä on ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia-massaspektrometri (UHPLC-MS).⁸ Antioksidanttiseen kapasiteettiin on useampi analyysimenetelmä, joita ovat muun muassa 2,2-difenyyl-1-pikryylihydratsyyli eli DPPH-menetelmä¹, ferric reducing activity power eli FRAP-menetelmä³, total radical trapping antioxidant parameter eli TRAP-menetelmä², happiradikaalin absorbanssikyky eli ORAC menetelmä², 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) eli ABTS-menetelmä.¹ Kyseiset antioksidanttista kapasiteettia mittaavat menetelmät toimivat eri periaatteilla ja antavat täten eri tuloksia toisiinsa verratessa.¹⁹

Tulokset saaduista analyyseista voidaan ilmoittaa usealla eri tavalla. Fenoliselle kokonaismäärälle [mg/g], [mg 100 g⁻¹], [mg gallushappo (GA)/g], [gallushappo ekvivalentti (GAE) µmol/g], [g GAE/kg] ja [mg/100 ml tanniinihappo ekvivalentti (TAE)] olivat tutkimuksissa annetut yksiköt. Antosyaaniselle kokonaismäärälle tutkimuksissa annetut yksiköt olivat [mg/g], [mg syanidiini-3-glukosidi 100 g⁻¹], [mg/100 g] ja [mg (syanidiini-3-glukosidi) /g], ja antioksidanttiselle kapasiteetille [g DPPH/g], [µmol trolox ekvivalentti (TE)/g], [µM TE g⁻¹] ja [g askorbiinihappo ekvivalentti (AAE)/kg].

2.2. Polyfenolit, antosyaanit ja antioksidanttisuus

Polyfenolit muodostuvat kasveissa toissijaisina aineenvaihduntatuotteina. Marjoissa ne näkyvät muun muassa marjan värinä. Niille ei ole ihmisen elimistössä mitään tärkeää roolia, mutta niille on osoitettu olevan elimistössä hyviä terveysvaikutuksia. Polyfenolit jaetaan kahteen ryhmään, flavonoideihin ja ei-flavonoideihin. Flavonoidien ryhmään kuuluvat esimerkiksi antosyaanit. Ei-flavonoideihin kuuluu esimerkiksi fenoliset hapot ja tanniinit. Jokainen yhdiste, jossa on fenoliyksikkö, eli aromaattinen rengas, johon on liittynyt hydroksyyli-ryhmä, voidaan sanoa kuuluvaksi fenolisiin yhdisteisiin. Polyfenolien rakenteessa on useampi fenoliyksikkö. Flavonoidit eroavat ei-flavonoideista, sillä niillä on yhteinen C6-C3-C6 rakenne, joka on merkattu sinisellä värillä delfinidiini 3-O-rutinosidin (**1**) rakenteeseen.²⁰



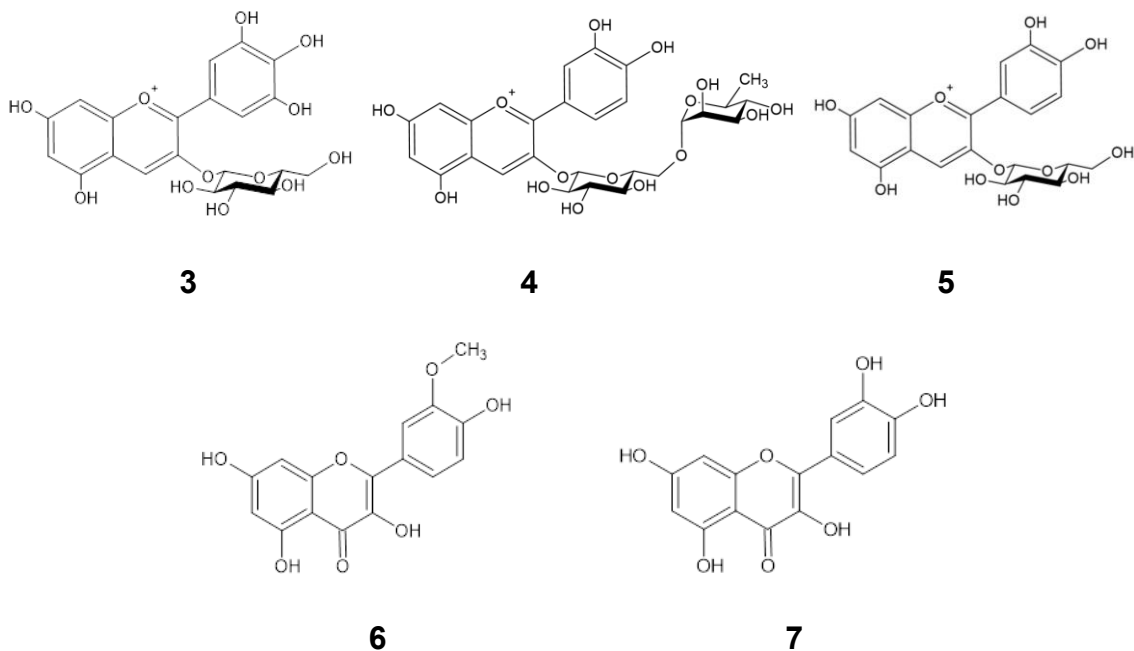
Antosyaanit ovat tummia, kuten punaisia ja sinisiä pigmenttejä kasvien kukissa ja marjoissa.²¹ Marjoissa nämä sijaitsevat varsinkin marjan kuoressa, joka jää mehustaessa marjapuristeeseen¹. Nämä kuuluvat yllä mainittuihin flavonoideihin.²¹ Antosyaaneilla (**2**) on yhteinen antosyaanin perusrakenne. Antosyaanit esiintyvät usein glukosideina, eli johonkin antosyaanimolekyylisiin on liittynyt glukoosimolekyyli-ryhmän R³ paikalle. Ilman glukoosia molekyylistä käytetään nimeä antosyanidi.²⁰ Merkittävimpiä antosyanidiineja kasveissa ovat muun muassa syanidiini, delfinidiini ja pelargoniini. Syanidiini antaa punaviolettin värin ja delfinidiini violetin värin.²¹

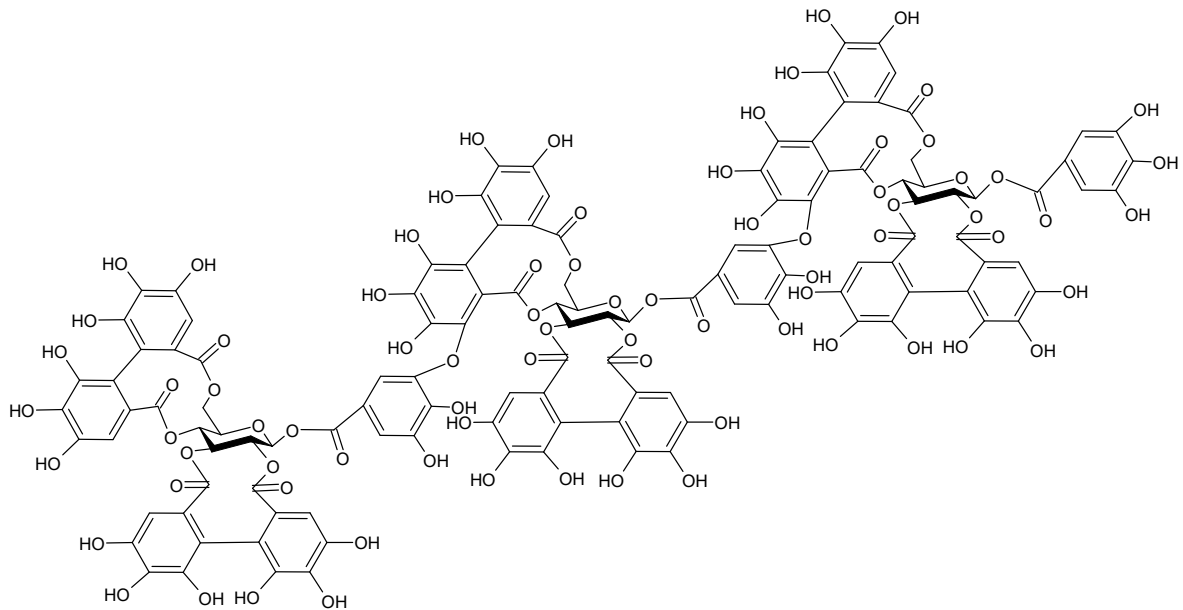
Antosyaanien terveyttä edistävät vaikutukset tulevat niiden antioksidanttisista ominaisuuksista. Antioksidantit kontrolloivat oksidatiivisia eli hapettumisprosesseja kehossa ja niiden aiheuttamia sairauksia.¹⁹ Niillä on todettu olevan ehkäisevä vaikutus sydän- ja verisuonitaudeille¹², ne voivat auttaa syövän ehkäisyssä, tulehduksissa ja muissa terveyttä edistävissä tapauksissa.¹¹

3. MARJAT

3.1. Marjapuristeen fenolinen koostumus

Marjoilla ulkomuoto voi olla samankaltainen, kuten mustikalla ja mustaviinimarjalla, tai hyvin erilainen, esimerkiksi verraten edellisiä tyrniin ja hillaan. Lopullinen ero löytyy niiden välillä kemiallisista koostumuseroista. Puganen tutkimusryhmineen² määrittä mustaviinimarjan fenolisia komponentteja. He mainitsivat, että mustaviinimarjan fenolisista yhdisteistä noin 90 % on antosyaaneja, joita olivat muun muassa 32 % delfinidiini 3-O-rutinosidia (**1**), 22 % delfinidiini 3-O-glykosidia (**3**), 26 % syanidiini 3-O-rutinosidia (**4**) ja 6 % syanidiini 3-O-glykosidia (**5**) fenolisesta kokonaismäärästä. Villissä mustikassa eniten antosyaaneista oli delfinidiini 3-O-glykosidia (**3**), joka on sama, mitä mustaviinimarjassa mainittiin olevan 22%.⁶ Mustikasta on tunnistettu 58 fenolista yhdistettä, joista antosyaaneja oli 15.⁸ Tyrnissä kaksi merkittävimmistä flavonolijohdannaisista olivat isorhamnetin (**6**) ja kversetiini (**7**). Näistä kversetiini mahdollisesti aiheuttaa alkuvaiheessa suurimman reaktion antioksidanttikapasitanssitestissä DPPH-menetelmällä.² Mustikassa, mustaviinimarjassa ja tyrnissä suurin polyfenolinen yhdisteryhmä kuuluu flavonoideihin. Hilla eroaa näistä, sillä suurin polyfenolinen yhdisteryhmä, ellagitanniinit kuuluvat ei-flavonoideihin. Suora-infuusion massaspektrometrissä vallitsevampana näkyi lambertianin C (**8**).¹⁵





8

3.2. Mustikka

Katsoessa tutkimuksia, jotka ovat tehty mustikoista, otetaan huomioon se, onko tutkimus tehty pensasmustikasta (*vaccinium corymbosum*) vai villistä mustikasta (*vaccinium myrtillus*). Visuaalinen ero villin mustikan ja pensasmustikan välillä on se, että pensasmustikalla vain kuori on tummansininen, kun taas villillä mustikalla koko marja on tummansininen. Tässä kaksi tutkimusta tehtiin villistä mustikasta ja kaksi pensasmustikasta. Villin mustikan tutkimukset olivat Euroopasta, joista ensimmäinen oli Latviasta ja toinen Suomesta.

Villin mustikan ja pensasmustikan kuorista uutettiin antosyaaneja ja polyfenoleja kahdella eri liuottimella, etanolilla ja metanolilla, joihin lisättiin metaanihappoa tai trifluorietaanihappoa. Optimaalinen liuottimen koostumus määritettiin, joka oli etanolin tai metanolin sekoitus trifluorietaanihapon kanssa. Lopullinen uutto tehtiin ultraääniavustetusti. Klavins tutkimusryhmineen⁶ eivät tutkineet ainoastaan marjapuristetta, vaan myös kokonaista marjaa. Kiinnostus oli antosyaaneissa, joten niille annettiin numeerinen kokonaismäärä, joka oli $284,95 \pm 25,18$ mg/g. Pensasmustikalle kyseinen arvo oli $84,12 \pm 4,08$ mg/g. Ero puristeen ja kokonaisen marjan välillä oli se, että puriste sisälsi enemmän polyfenoleja, vaikka ero ei ollut merkittävä.⁶

Laaksonen tutkimusryhmineen⁸ tutki villiä mustikkaa, jotka oli poimittu Suomesta. Tutkimukset tehtiin kokonaiselle marjalle, puristetulle mehulle, marjapuristeelle, neljälle marjapuristeen uutteelle ja kahdelle uuton ylijäämälle. Näille annettiin tuore- ja kuivapaino sekä kokonaismäärä muun muassa antosyaaneille. Kokonainen marja sisälsi 2500 mg, mehu 220 mg ja puriste 2300 mg antosyaaneja. Näiden tuore- ja kuivapainot olivat 1000 g ja 105 g, 850 g ja 45 g, ja 150 g ja 55 g.⁸

Struck tutkimusryhmineen¹ kävi läpi kahta eri tutkimusta pensasmustikasta. Kummassakin tutkimuksen kohteena oli koko marja, mutta ensimmäisessä myös marjapuriste ja toisessa marjan kuori. Ensimmäisessä tutkimuksessa antioksidanttinen kapasiteetti analysoitiin sekä DPPH että ABTS menetelmällä. Koko marjan antioksidanttinen kapasiteetti oli 480,84 g DPPH/g (kuiva massa (DM)) (DPPH) ja 234,74 $\mu\text{mol TE/g (DM)}$ (ABTS). Marjapuristeen antioksidanttinen kapasiteetti oli 919,71 g DPPH/g (DM) (DPPH) ja 122,56 $\mu\text{mol TE/g (DM)}$ (ABTS). Toisessa tutkimuksessa analysoitiin fenolinen kokonaismäärä ja FRAP menetelmällä antioksidanttinen kapasiteetti. Fenolinen kokonaismäärä koko marjassa oli 737,5 mg 100 g⁻¹ (märkä massa (WM)) ja kuoressa 300,4 mg 100 g⁻¹ (WM). Antioksidanttinen kapasiteetti koko marjassa oli 39,9 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (WM) ja kuoressa 28,7 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (WM).¹

Tagliani tutkimusryhmineen⁴ eivät mainitse onko marjapuriste villi mustikka vai pensasmustikka, mutta koska mustikkanäytteet ovat Uruguaysta ja mustikasta käytetään nimeä "blueberry", voidaan olettaa sen olevan pensasmustikka. Siitä tutkittiin fenolinen kokonaismäärä, joka oli 285,14 \pm 4,48 mg GA/g (kuiva paino), antosyaaninen kokonaismäärä, joka oli 125,82 \pm 5,89 mg syanidiini-3-glukosidi 100 g⁻¹ (kuivapaino) ja antioksidanttinen kapasiteetti, joka oli 339,09 \pm 2,69 $\mu\text{M TE g}^{-1}$ (kuivapaino). Antioksidanttinen kapasiteetti analysoitiin ABTS menetelmällä.⁴

3.3. Mustaviinimarja

Struck tutkimusryhmineen¹ kävi läpi kahta eri tutkimusta mustaviinimarjasta, joista ensimmäinen oli siemenetön marjapuriste ja toinen oli sekä marjapuriste että koko marja. Ensimmäisestä analysoitiin fenolisen kokonaismäärän lisäksi antioksidanttinen kapasiteetti, joka oli tehty DPPH menetelmällä. Fenolinen kokonaismäärä ensimmäisessä tutkimuksessa oli 2072,6 mg 100 g⁻¹ ja

antioksidanttinen kapasiteetti $101,0 \mu\text{mol TE g}^{-1}$ (WM). Toisessa tutkimuksessa koko marjan fenolinen kokonaismäärä oli $625 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ja puristeen $2004 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

Puristamisen ja esikäsitteilyn jälkeen mustaviinimarjapuriste uutettiin kiinteä-nesteuuttomenetelmällä neljä perättäistä kertaa käyttäen liuottimena etanolia. Näistä analysoitiin kolme eri fenolista pitoisuutta, joista fenolinen kokonaismäärä on tarkastelun kohteena. Ensimmäisestä neljanteen kokonaismäärät olivat $55,3 \pm 10,8 \text{ GAE } \mu\text{mol/g}$ (tuore paino (FW)), $58,7 \pm 1,3 \text{ GAE } \mu\text{mol/g}$ (FW), $13,8 \pm 0,8 \text{ GAE } \mu\text{mol/g}$ (FW), $7,8 \pm 0,7 \text{ GAE } \mu\text{mol/g}$ (FW). Kaikki uutteen summattuina, fenoliseksi kokonaismääräksi saatiin $327 \text{ GAE } \mu\text{mol/g}$ (Kuiva paino (DW)). Jokaisesta uutteesta analysoitiin lisäksi antioksidanttinen kapasiteetti ORAC ja TRAP menetelmillä. Mustaviinimarjalle saatiin jokaisesta uutteesta ja jäännöksestä yhteensä $633 \text{ (TE) } \mu\text{mol/g}$ (DW) ORAC menetelmällä ja $140 \text{ (TE) } \mu\text{mol/g}$ (DW) TRAP menetelmällä.²

Suomen kolme eri mustaviinimarjalajiketta kasvatettiin sekä pohjoisessa että etelässä ja niistä tutkittiin fenolista ja antosyaanista kokonaismäärää. Fenolinen kokonaismäärä sekoitukselle jokaista lajiketta oli etelässä kasvaneille $347,70 \pm 80,93 \text{ mg/ } 100 \text{ g}$ ja pohjoisessa kasvaneille $274,17 \pm 72,40 \text{ mg/ } 100 \text{ g}$. Antosyaaninen kokonaismäärä oli etelässä kasvaneille $330,95 \pm 80,41 \text{ mg/ } 100 \text{ g}$ ja pohjoisessa kasvaneille $258,15 \pm 72,64 \text{ mg/ } 100 \text{ g}$.⁹

3.4. Tyrni

Tyrnipuristeen esikäsitteilyyn kuului normaalin prosessin lisäksi lipofiilisen fraktion eli rasvan poisto. Tämä tapahtui superkriittisellä nesteuutolla, jossa käytettiin hiilidioksidia superkriittisenä nesteenä. Tämän jälkeen puriste uutettiin paineistetulla nesteuutolla ja kahdella eri liuottimella, etanolilla ja vedellä. Lisäksi puristeesta tehtiin kaksi eri materiaalia kuiva uute ja kuiva jauhe. Fenoliseksi kokonaismääräksi saatiin kuivalle uutteelle $65,61 \pm 4,80 \text{ mg GAE/g}$ (etanoli) ja $98,10 \pm 2,01 \text{ mg GAE/g}$ (vesi), ja kuivalle jauheelle $7,87 \pm 0,31 \text{ mg GAE/g}$ (etanoli) ja $4,71 \pm 0,43 \text{ mg GAE/g}$ (vesi). Antioksidanttinen kapasiteetti analysoitiin ORAC, ABTS ja DPPH testeillä, joiden tulokset on esitetty taulukossa 3.¹¹

Taulukko 3. Antioksidanttiset kapasiteetit tyrnipuristeen uutemateriaaleille.

	MATERIAALI	ETANOLI	VESI
ORAC $\mu\text{M TE/G}$	Kuiva uute	294,1 \pm 6,53	371,8 \pm 8,31
	Kuiva jauhe	35,26 \pm 2,41	15,84 \pm 0,75
ABTS $\mu\text{M TE/G}$	Kuiva uute	268,5 \pm 7,10	323,9 \pm 10,33
	Kuiva jauhe	32,19 \pm 1,22	13,80 \pm 2,36
DPPH $\mu\text{M TE/G}$	Kuiva uute	102,3 \pm 4,31	205,0 \pm 6,62
	Kuiva jauhe	12,27 \pm 0,51	8,73 \pm 0,33

Tyrnistä otettiin kaksi eri otetta, jotka olivat kasvaneet Suomessa sekä pohjoisessa että etelässä. Ennen uuttamista tyrnit kylmäpuristettiin. Kummankin otteen puristeet uutettiin neljä perättäistä kertaa kiinteä-nesteuutolla, joista saadut uutteen sitten analysoitiin. Tulokset antoivat ensimmäisille suurimman arvon ja neljäsille pienimmän. Etelän tyrninäytteet antoivat kokeissa pienempiä fenolisen kokonaismäärän arvoja kuin pohjoisen tyrninäytteet. Ensimmäisen uutteen tulokset etelän tyrnille olivat 8,8 \pm 0,6 GAE $\mu\text{mol/g}$ (FW) ja pohjoisen tyrnille 13,6 \pm 1,1 GAE $\mu\text{mol/g}$ (FW). Kaikkien uutteen ja jäännöksen yhteenlaskettu määrä oli etelän tyrnille 55 GAE $\mu\text{mol/g}$ (DW) ja pohjoisen 90 GAE $\mu\text{mol/g}$ (DW). Tyrnille tehtiin myös TRAP ja ORAC testit tutkimaan antioksidanttista kapasiteettia. ORAC menetelmällä saatiin etelän tyrille 161 TE $\mu\text{mol/g}$ (DW) ja pohjoisen tyrnille 471 TE $\mu\text{mol/g}$ (DW). TRAP menetelmällä saatiin etelän tyrnille 17 TE $\mu\text{mol/g}$ (DW) ja pohjoisen 52 TE $\mu\text{mol/g}$ (DW).²

Rop tutkimusryhmineen¹² tutkivat kuutta eri tyrnilajiketta Sveitsistä, jossa marjat eivät olleet puristeena, vaan kokonaisia. Nämä prosessoitiin heti keräämisen jälkeen. Eri lajikkeiden välillä fenolinen kokonaismäärä vaihteli 8,62 \pm 1,51 g GAE/kg FM ja 14,17 \pm 1,43 g GAE/kg FM välillä. Antioksidanttinen kapasiteetti analysoitiin DPPH menetelmällä ja suurin saatu lukema saatiin venäläisestä lajikkeesta ja se oli 18,11 g AAE/kg (FM).

Kokonaiset kuivat tyrnit hienonnettiin, minkä jälkeen aloitettiin suoraan kiinteä-nesteuuttaminen etanolilla. Uutteesta analysoitiin fenolinen kokonaismäärä, joka oli 24,84 \pm 0,06 mg/100 ml tanniinihappoekvivalenttina.¹³

3.5. Hilla

Tutkimus tehtiin neljästä eri kloonista hilloja, jotka kerättiin kolmena eri vuonna. Nämä jäädytettiin kokonaisina ja kylmäkuivattiin ennen kiinteä-nesteuuttoa. Mittaukset tehtiin kloonien, vuoden ja keräysajan mukaan, joista huomioon otetaan mittaukset vuoden mukaan. Tutkittavana olivat siis fenolinen kokonaismäärä (TP) ja antosyaaninen kokonaismäärä (TA). Saadut tulokset on esitetty taulukossa 4. Vuonna 2012 kerätyillä marjoilla fenolinen ja antosyaaninen kokonaismäärä oli suuremmat kuin vuosina 2013 ja 2014.¹⁴

Taulukko 4. Fenolinen ja antosyaaninen kokonaismäärä vuosina 2012–2014

	TP [mg GAE/g DW]	TA [mg (syaniidiini-3-glukosidi)/g DW]
2012	23,19	0,32
2013	20,51	0,10
2014	19,57	0,12

Hillat kerättiin Norjassa, jossa ne jäädytettiin ja voitiin pitää varastoituna jopa 5 kuukautta. Marjoja ei puristettu, vaan koe tehtiin kokonaisista marjoista, jotka hienonnettiin ennen uuttoa. Uutto tehtiin kiinteä-nesteuuttomenetelmällä käyttäen metanolia liuottimena. Hillasta mitattiin antosyaanien kokonaismäärä, fenolinen kokonaismäärä ja lisäksi antioksidanttinen kapasiteetti kahdella menetelmällä, jotka olivat FRAP ja DPPH. antosyaaninen kokonaismäärä oli 0,3 mg 100 g⁻¹ (FW), fenolinen kokonaismäärä annettiin välille 295–327 mg 100 g⁻¹ GAE (FW) ja antioksidanttinen kapasiteetti annettiin välille 6,7–6,9 µmol g⁻¹ TE (FW) (FRAP) ja välille 19,2–25,6 µmol g⁻¹ TE (FW) (DPPH).³

3.6. Marjojen vertailua

Jotta tuloksia voitaisiin vertailla toisiinsa, on niiden esitystapa oltava vähintään suhteellisen samankaltainen. Jos käytetty menetelmä on sama, vertailu helpottuu entisestään. Esimerkiksi antioksidanttinen kapasiteetti voi vaihdella suuresti, jos tutkimus on tehty samalle marjalle, mutta eri menetelmällä. Mustaviinimarjalle tehdyssä tutkimuksessa ORAC menetelmällä saadaan suuremmat tulokset kuin TRAP menetelmällä.²

Mustikasta tutkittiin sekä villiä mustikkaa että pensasmustikkaa. Näistä villillä mustikalla on suurempi antosyaaninen kokonaismäärä verrattuna pensasmustikkaan, joka johtuu siitä, että villi mustikka on myös sisältä tumman värinen, kun taas pensasmustikka on sisältä vaalea.

Erot tutkituilla marjoilla ovat ilmiselvät sekä ulkonäöllisesti, että koostumukseltaan. Tutkittavien neljän marjan välillä suurimpia tuloksia fenoliselle kokonaismäärälle, antosyaaniselle kokonaismäärälle ja antioksidanttiselle kapasiteetille saivat sekä mustikka että mustaviinimarja, jonka jälkeen tyrni ja viimeisenä hilla. Eroja ei ollut pelkästään eri marjojen välillä, vaan myös saman marjan tutkimuksissa riippuen esimerkiksi siitä, millä leveysasteilla marja oli kasvanut, kuten tyrnillä. Pohjoisessa kasvaneet tyrnit saivat suurempia tuloksia, kuin etelässä kasvaneet.² Millaiset kasvuolosuhteet minäkin vuonna ovat olleet voivat myös vaikuttaa saman marjan tuloksiin, kuten Hykkerud tutkimusryhmineen¹⁴ osoittivat.

Tutkimuksissa oli marjapuristeen lisäksi tutkittu kokonaista marjaa. Tulokset yleisesti kokonaisen marjan ja marjapuristeen välillä osoittaa marjapuristeessa fenolisten määrien olevan suurempia verrattuna alkuperäiseen materiaalin määrään.

4. YHTEENVETO

Marjapuristeen prosessointi sen sisältämien fenolisten uuteaineiden analysoimiseksi voidaan suorittaa eri tavoin. Tärkeintä on tutkittavien polyfenolien säilyminen hajoamatta eri prosessivaiheiden, kuten esikäsitteilyn ja uuton läpi. Jokaiselle vaiheelle on mietittävä olosuhteiden vaikutus näihin bioaktiivisiin yhdisteisiin, jotka ovat lämpöherkkiä yhdisteitä. Jäätäneen marjapuristeen kuivauksessa suositaan kylmäkuivausta, jossa vesi sublimoituu puristeesta. Uuttovaiheessa suurten lämpötilojen vaikutusta voidaan ehkäistä käyttämällä tavallisen kiinteä-nesteuuton sijaan paineistettua kuumavesiuuttoa. Tällä menetelmällä saadaan lisäksi käytettyjä ympäristöystävällisiä liuottimia.

Polyfenolit muodostuvat kasveissa toissijaisina aineenvaihduntatuotteina ja niiden alalaji antosyaanit näkyvät esimerkiksi marjoissa tummina väripigmentteinä. Tutkielmassa tarkastellut tummat marjat, mustikka ja mustaviinimarja, sisälsivät vähintään yhden yhteisen antosyaaniyhdisteen. Mustikalla, mustaviinimarjalla ja tyrnillä suurimmilla polyfenolisilla yhdisteillä on sama flavonoidien perusrakenne. Lambertianin C, hillan suurin polyfenolinen yhdiste kuuluu ei-flavonoideihin, mikä erottaa hillan edellisistä.

Tutkimustulokset kustakin marjasta ovat keskenään yhteneväisiä ja vertaillessa kaikkia neljää keskenään huomataan fenolisten kokonaismäärien, antosyaanisten kokonaismäärien ja antioksidanttisen kapasiteetin laskevan mustikasta ja mustaviinimarjasta tyrniin ja hillaan.

Jättemäärän vähentäminen, joka marjojen puristamisessa syntyy, olisi hyvä ympäristölle. Koska marjapuristeesta löytyville polyfenoleille on tutkittu olevan terveydelle edistäviä vaikutuksia niiden antioksidanttisuuden takia, voisi niiden käyttö esimerkiksi farmaseuttisissa tuotteissa olla haluttua. Marjapuristeesta uutettujen aineiden lisäksi myös itse marjapuristetta voidaan käyttää esimerkiksi raaka-aineena terveysvaikutteisissa elintarvikkeissa. Tieto marjapuristeen ominaisarvoista auttaa jatkossa puristeen monenlaisessa hyödyntämisessä ja lisäksi polyfenolien tutkimisella ja hyödyntämisellä toivotaan luonnollisten antioksidanttien korvaavan synteettiset.

5. VIITTEET

- (1) Struck, S.; Plaza, M.; Turner, C.; Rohm, H. Berry Pomace - A Review of Processing and Chemical Analysis of Its Polyphenols. *Int J Food Sci Technol* **2016**, *51* (6), 1305–1318.
- (2) Pukanen, A.; Kallio, H. P.; Schaich, K. M.; Suomela, J.-P.; Yang, B. Red/Green Currant and Sea Buckthorn Berry Press Residues as Potential Sources of Antioxidants for Food Use. *J Agric Food Chem* **2018**, *66* (13), 3426–3434.
- (3) Skrede, G.; Martinsen, B. K.; Wold, A.-B.; Birkeland, S.-E.; Aaby, K. Variation in Quality Parameters between and within 14 Nordic Tree Fruit and Berry Species. *Acta Agric Scand B Soil Plant Sci* **2012**, *62* (3), 193–208.
- (4) Tagliani, C.; Perez, C.; Curutchet, A.; Arcia, P.; Cozzano, S. Blueberry Pomace, Valorization of an Industry by-Product Source of Fibre with Antioxidant Capacity. *Food Science and Technology* **2019**, *39* (3), 644–651.
- (5) Ratti, C. Freeze Drying for Food Powder Production. In *Handbook of Food Powders: Processes and Properties*; Elsevier Inc., 2013; pp 57–84.
- (6) Klavins, L.; Kviesis, J.; Nakurte, I.; Klavins, M. Berry Press Residues as a Valuable Source of Polyphenolics: Extraction Optimisation and Analysis. *LWT* **2018**, *93*, 583–591.
- (7) Čanadanović-Brunet, J.; Tumbas Šaponjac, V.; Stajčić, S.; Četković, G.; Čanadanović, V.; Čebović, T.; Vulić, J. Polyphenolic Composition, Antiradical and Hepatoprotective Activities of Bilberry and Blackberry Pomace Extracts. *J Berry Res* **2019**, *9* (2), 349–362.
- (8) Laaksonen, O.; Sandell, M.; Kallio, H. Chemical Factors Contributing to Orosensory Profiles of Bilberry (*Vaccinium Myrtillus*) Fractions. *European Food Research and Technology* **2010**, *231* (2), 271–285.
- (9) Zheng, J.; Yang, B.; Ruusunen, V.; Laaksonen, O.; Tahvonen, R.; Hellsten, J.; Kallio, H. Compositional Differences of Phenolic Compounds between Black Currant (*Ribes Nigrum* L.) Cultivars and Their Response to Latitude and Weather Conditions. *J Agric Food Chem* **2012**, *60* (26), 6581–6593.
- (10) Reißner, A.-M.; Al-Hamimi, S.; Quiles, A.; Schmidt, C.; Struck, S.; Hernando, I.; Turner, C.; Rohm, H. Composition and Physicochemical Properties of Dried Berry Pomace. *J Sci Food Agric* **2019**, *99* (3), 1284–1293.
- (11) Dienaitė, L.; Pukalskas, A.; Pukalskienė, M.; Pereira, C. v; Matias, A. A.; Venskutonis, P. R. Phytochemical Composition, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Defatted Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Berry Pomace Fractions Consecutively Recovered by Pressurized Ethanol and Water. *Antioxidants* **2020**, *9* (4).
- (12) Rop, O.; Ercişli, S.; Mlcek, J.; Jurikova, T.; Hoza, I. Antioxidant and Radical Scavenging Activities in Fruits of 6 Sea Buckthorn (*Hippophaë Rhamnoides* L.) Cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **2014**, *38* (2), 224–232.
- (13) Papuc, C.; Diaconescu, C.; Nicorescu, V.; Crivineanu, C. Antioxidant Activity of Polyphenols from Sea Buckthorn Fruits (*Hippophaë Rhamnoides*). *Revista de Chimie* **2008**, *59* (4), 392–394.

- (14) Hykkerud, A. L.; Uleberg, E.; Hansen, E.; Vervoort, M.; Mølmann, J.; Martinussen, I. Seasonal and Yearly Variation of Total Polyphenols, Total Anthocyanins and Ellagic Acid in Different Clones of Cloudberry (*Rubus Chamaemorus* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality* **2018**, *91*, 96–102.
- (15) McDougall, G.; Martinussen, I.; Stewart, D. Towards Fruitful Metabolomics: High Throughput Analyses of Polyphenol Composition in Berries Using Direct Infusion Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2008**, *871* (2), 362–369.
- (16) Alara, O. R.; Abdurahman, N. H.; Ukaegbu, C. I. Extraction of Phenolic Compounds: A Review. *Current Research in Food Science*. Elsevier B.V. January 1, 2021, pp 200–214.
- (17) Plaza, M.; Marina, M. L. Pressurized Hot Water Extraction of Bioactives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *116*, 236–247.
- (18) Wong-Paz, J. E.; Muñiz-Márquez, D. B.; Aguilar-Zárata, P.; Ascacio-Valdés, J. A.; Cruz, K.; Reyes-Luna, C.; Rodríguez, R.; Aguilar, C. N. Extraction of Bioactive Phenolic Compounds by Alternative Technologies. *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food* **2017**, 229–252.
- (19) Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal Methods* **2009**, *2* (1), 41–60.
- (20) di Lorenzo, C.; Colombo, F.; Biella, S.; Stockley, C.; Restani, P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 2021.
- (21) Khoo, H. E.; Azlan, A.; Tang, S. T.; Lim, S. M. Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and the Potential Health Benefits. *Food and Nutrition Research*. 2017.