

Koivumahlan sisältämät yhdisteet

Kirjallisuuskatsaus

Sirpa Peräniemi

ELTUVA-hanke

Itä-Suomen yliopisto

2024



**Euroopan unionin
osarahoittama**



Pohjois-Savon liitto



UNIVERSITY OF
EASTERN FINLAND

SAVGGROW
KEHITYSYHTIÖ

Koivumahlan sisältämät yhdisteet
Kirjalisuuskatsaus 35 s.
Sirpa Peräniemi
ELTUVA-hanke
Itä-Suomen yliopisto
2024

TIIVISTELMÄ

Koivumahlaa on perinteisesti käytetty juomana, joko tuoreena tai fermentoituna, tai siitä on valmistettu koivusiirappia. Koivumahla sisältää pääosin vettä (99 %) ja sen kiintoaineksesta suurin osa on sokereita. Päähiilihydraatit ovat glukoosi ja fruktoosi, joiden lisäksi mahla sisältää pienempiä määriä muita sokereita (mm. sakkaroosi, galaktoosi).

Hiilihydraattien lisäksi koivumahla sisältää orgaanisia happoja ja fosforihappoa. Orgaaniset hapot ovat pääosin hedelmähappoja: omenahappo, meripihkahappo, fumaarihappo, viinihappo ja sitruunahappo. Myös pieniä määriä muita happoja (esim. muurahaishappo, etikkahappo ja maitohappo) on havaittu. Happojen määrän suhde sokerien määrään vaikuttaa mahlan koettuun makeuteen.

Koivumahla sisältää myös pieniä määriä vapaita aminohappoja. Useimmiten havaittuja aminohappoja ovat sitrulliini, glutamiini, glutamiinihappo, isoleusiini, valiini ja aspargiini, joita on 92–97 % kokonaisaminohappomäärästä. Mahla sisältää myös useista aminohappoyksiköistä koostuvia proteiineja. Koivumahlasta on löydetty pieniä määriä C-vitamiinia ja B-ryhmän vitamiineja (B9 ja B8), fenoliyhdisteitä (mm. fenolihapot, flavonoidit ja tanniinit) ja triterpeenejä. Näillä yhdisteillä on antioksidanttisia ominaisuuksia.

Koivumahla sisältää myös ravitsemuksen kannalta arvokkaita kivennäisaineita. Mahlan sisältämiä makrokivennäisaineita ovat kalsium, magnesium, kalium, natrium, fosfori ja rikki. Koivumahlan sisältämiä mikrokivennäisaineita ovat mm. sinkki, mangaani ja kupari, joiden pitoisuudet ovat ravitsemuksen kannalta korkeita. Koivumahla saattaa myös sisältää terveydelle haitallisia raskasmetalleja (mm. nikkeliä, kadmiumia ja lyijyä). Jos koivumahlasta valmistetaan koivusiirappia, niin on hyvä ottaa huomioon, että tällöin mikrokivennäisaineet ja raskasmetallit konsentroituvat.

Koivumahlan määrään ja yhdisteiden pitoisuuksiin koivumahlassa vaikuttavat monet tekijät: koivulaji, puun koko ja ikä, mahlan erittymisen vaihe, vuorokaudenaika, puun kasvuolosuhteet (maaperän hedelmällisyys ja kosteus, teollinen alue/maaseutu) ja ilmasto-olosuhteet.

Sisällysluettelo	s.
1. Koivumahla	5
2. Hiilihydraatit	6
3. Orgaaniset hapot ja fosforihappo	9
4. Vitamiinit, fenolihdisteet ja triterpeenit	11
4.1. Vitamiinit	11
4.2. Fenolihdisteet	12
4.3. Triterpeenit	15
4.4. Antioksidanttiaktiivisuus	15
5. Aminohapot	17
6. Proteiinit	19
7. Metallit ja muut alkuaineet	22
7.1. Kalium, kalsium, magnesium ja natrium	22
7.2. Magnaani, sinkki, kupari ja rauta	24
7.3. Kromi, rubidium, seleeni ja strontium	26
7.4. Haitalliset raskasmetallit (Cd, Ni ja Pb)	27
7.5. Fosfori, rikki ja typpi	29
8. Kirjallisuusviitteet	31
9. Liitteet	36

1. Luettelo koivumahlasta LC-MS/MS-menetelmällä tunnistetuista proteiineista

LYHENTEET:

ABTS	2,2'-Atsinobis(3-etyylibentsotiatsoliini-6-sulfonihappo)
CUPRAC	Kupari(II)pelkistysantioksidanttikapasiteetti (<i>CUPric Reducing Antioxidant Capacity</i>)
DPPH	2,2-Difenyyli-1-pikryylihydratsyyli ja antioksidanttiaktiivisuuden määrittäminen menetelmä
EFSA	Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen (<i>European Food Safety Authority</i>)
EPA	USA:n ympäristönsuojeluvirasto (<i>Environmental Protection Agency</i>)
EU	Euroopan unioni (<i>European Union</i>)
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirastolääkevirasto (<i>Food & Drug Administration</i>)
FRAP	Rauta(III)pelkistysaktiivisuusteho (<i>Ferric Reducing Activity Power</i>)
GAE	Gallushappoekvivalentti (<i>Gallic Acid Equivalent</i>)
GC	Kaasukromatografia (<i>Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Kaasukromatografia-massaspektrometria (<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
HORAC	Hydroksyyliiradikaali-antioksidanttikapasiteetti (<i>Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity</i>)
HPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-MS	HPLC- massaspektrometria (<i>HPLC Mass Spectrometry</i>)
IC	Ionikromatografia (<i>Ion Chromatography</i>)
ICP-OES	Induktiivisesti kytketty plasma-optinen emissiospektrometria (<i>Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry</i>)
ICP-MS	ICP-massaspektrometria (<i>ICP- Mass Spectrometry</i>)
LC	Nestekromatografia (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS/MS	Nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (<i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>)
LOD	Toteamisraja (<i>Lower limit of Detection</i>)
ORAC	Happiradikaalin absorbanssikyky (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)
MS	Massaspektrometria (<i>Mass Spectrometry</i>)
NIH	Yhdysvaltain terveysvirasto (<i>National Institutes of Health</i>)
rp	ruumiinpaino
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamideGel Electrophoresis</i>)
TDI	Siedettävä päiväsaanti (<i>Tolerable Daily Intake</i>)
TMS	Tetrametyylisilaani (TetraMethylSilane)
TOSC	Kokonaisoksidiraadikaalisieppauskapasiteetti (<i>Total Oxyradical Scavenging Capacity</i>)
TRAP	Kokonaisradikaalisieppausantioksidanttiparametri (<i>Total Radical trapping Antioxidant Parameter</i>)
Trolox	6-Hydroksi-2,5,7,8-tetrametyyli-kromaani-2-karboksyli-happo
TWI	Siedettävä viikkosaanti (<i>Tolerable Weekly intake</i>)
TXRF	Kokonaisheijastusröntgenfluoresenssispektrometria (<i>Total Reflection X-ray Fluorescence spectrometry</i>)

1. Koivumahla

Mahla on lehtipuiden ravintoliuos, joka on pääosin vettä, ja sisältää lisäksi puun varastoimia ravintoaineita. Puu käyttää mahlaa keväällä kasvunsa käynnistämiseen. Koivumahlaa on kerätty perinteisesti keväisin juomaksi, joko tuoreena tai fermentoituna, Pohjoismaissa, Baltiassa, Itä-Euroopassa, Venäjällä, Saksassa (Svanberg *et al.* 2012) Koreassa (Jeong *et al.* 2012 ja 2013), Japanissa (Jiang *et al.* 2001) ja Espanjassa (Carpintero *et al.* 2023). Boreaalisella ja hemiboreaalisella alueilla koivumahlaa kerätään suoraan paikallisista koivulajeista, pääasiassa rauduskoivusta (*Betula pendula Roth*) ja hieskoivusta (*Betula pubescens Ehrh.*). Nämä koivulajit käsittävät 11-16 % Fennoskandian ja Venäjän metsien volyyymistä, n. 17 % Liettuan ja 24-28 % Latvian ja Valko-Venäjän metsistä. Keski-Euroopassa ne kattavat vain 1-5 % metsistä. (Mingaila *et al.* 2020) Koivumahlaa on käytetty myös elintarvikkeiden ja kosmetiikan raaka-aineena (Svanberg *et al.* 2012).

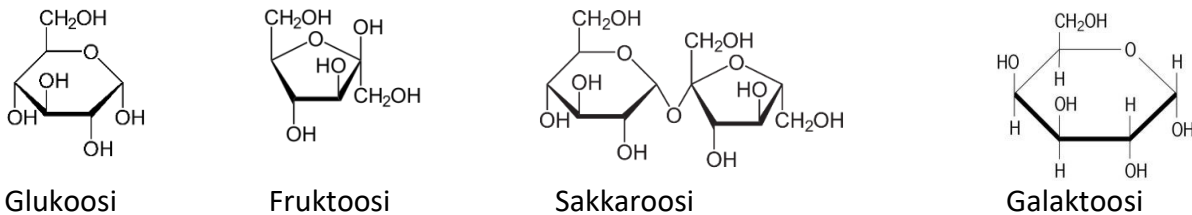
Koivumahla pilaantuu nopeasti mikrobiologisen hajoamisen seurauksena. Koivumahla säilyy hyvänä huoneenlämmössä noin päivän ja kylmässä noin kolme päivää (Viškelis *et al.* 2012). Tästä syystä käytetään monia keinoja pidentämään koivumahlan säilyvyyttä. Pakastaminen soveltuu pienille määrille mahlaa. Pastörointi ja lämpökäsittely muuttavat mahlaa makua ja voivat aiheuttaa monien arvokkaiden mahlan komponenttien ja niiden terveyttä edistävien ominaisuuksien katoamisen. Lisäksi korkeassa lämpötilassa on havaittu fruktoosin hajoamista, ja sen seurauksena koivumahlan värin muuttumista ruskeaksi. Kirjallisuudesta löytyy lisäksi useita vaihtoehtoisia menetelmiä, joista suurin osa perustuu fysikaalisiin tekniikoihin esim. ultraviolettisäteily, ultrasuodatus sekä niiden yhdistelmä. (Jeong *et al.* 2012 ja 2013) Näiden menetelmien huono puoli on kustannusten nousu sekä aseptisen pullotuksen ongelmat. Ne eivät myöskään ole omatoimikerääjien käytettävissä. (Bilek *et al.* 2016a)

Koivumahla on läpinäkyvä tai hieman opalisoiva neste. Koivumahlan makua kuvataan raikkaaksi, kuin hieman makeaksi vedeksi, joka ei ole hapanta tai karvasta. (Ozolicius *et al.* 2016, Grabek-Lejko *et al.* 2017, Mingaila *et al.* 2020) Suomalaisesta koivumahlasta 99 %:ia on vettä ja sen liuenneen kiintoaineen pitoisuus on n. 1 %, josta suurin osa on sokereita (Nordic Koivu 2024). Koivumahla on hieman hapanta (pH 5,5 – 7,5) ja sen pH on korkeimmillaan keruukauden alussa ja laskee kauden loppua kohden. Happamuus johtuu mahlassa olevista orgaanisista ja epäorgaanisista hapoista. (Jeong *et al.* 2012, Mingaila *et al.* 2020, Nordic Koivu 2024)

Koivumahla sisältää hiilihydraatteja (sokerit), orgaanisia happoja, aminohappoja ja fosforihappoa, sekä proteiineja, erilaisia kivennäisaineita ja joitakin bioaktiivisia aineita kuten fenolisyhdisteitä (esim. flavonoidit, tanniinit) ja C- ja B-ryhmän vitamiineja (esim. foolihappo). (Kuka *et al.* 2013) Koivumahlan määrään ja yhdisteiden pitoisuuksiin koivumahlassa vaikuttavat monet tekijät: koivulaji, puun koko ja ikä, mahlan erittymisen vaihe, vuorokaudenaika, puun kasvuolosuhteet (maaperän hedelmällisyys ja kosteus, teollinen alue/maaseutu), ilmasto-olosuhteet ja jopa ilmaston kaasujen koostumuksen muutokset. (Jeong *et al.* 2012, Ozolicius *et al.* 2016, Grabek-Lejko *et al.* 2017, Mingaila *et al.* 2020, Staniszewski *et al.* 2020, Kurttila 2022, Carpintero *et al.* 2023)

2. Hiilihydraatit

Pääosa koivumahlan liuenneesta kiintoaineesta on sokereita. Koivumahlan kokonaissokeripitoisuus vaihtelee Suomen n. 1 %:sta Puolan 2,5 -2,6 %:iin. Päähiilihydraatit ovat glukoosi ja fruktoosi (Kuva 1). Niiden pitoisuudet vaihtelevat 2-5 g/l (Taulukko 1) ja ne vastaavat 80 %:ia kokonaissokerimäärästä. Sakkaroosin (tavallinen sokeri, Kuva 1) määrä on 3-10 kertaa pienempi verrattuna fruktoosiin tai glukoosiin. (Grabek-Lejko *et al.* 2017) Koivumahlan on havaittu sisältävän myös pieniä määriä (0,01-0,03 g/l) galaktoosia (Kuva 1) (Kallio *et al.* 1987c).



Kuva 1. Glukoosin, fruktoosin, sakkaroosin ja galaktoosin rakenteet.

Taulukko 1. Mahlanäytteiden sokeripitoisuuksia.

Koivulaji	Glukoosi (g/l)	Fruktoosi (g/l)	Sakkaroosi (g/l)	Maa	Viite
<i>B. pendula</i> Roth, <i>B. ja var. carelica</i> Mercklin, <i>B. pubescens</i> Ehrh.	2,3 - 4,7	2,3 - 4,5	<0,7	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1985
<i>B. pendula</i> Roth., <i>B. pubescens</i> Ehrh.	5 - 8	5 - 8	0 - 0,7	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1987b
<i>Betula sap</i>	2 - 4	3 - 5		Suomi	Nordic Koivu 2024
<i>B. pendula</i>	9,3	12,1	3,2	Puola	Luczaj <i>et al.</i> 2014
<i>B. pubescens</i>	9,6	13,5	3,1	Puola	Luczaj <i>et al.</i> 2014
<i>B. pendula</i>	3,6 - 5,0	4,0 - 4,8	0 - 1,51	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015a
<i>B. pubescens</i>	2,0 - 3,0	1,8 - 2,8		Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015a
<i>B. pendula</i>	4,7 - 5,4	4,8 - 6,2	0,28 - 0,63	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
<i>B. pubescens</i>	3,5	3,9	0,014	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
<i>B. pendula</i>	4,6	5,4	0,58	Latvia	<i>Kuka et al.</i> 2013
<i>B. pendula</i> Roth	3,3	4,6	0,13	Latvia	Semjonovs <i>et al.</i> 2014
<i>B. pendula</i>	6,1 (monosakkaridit)		1,2	Latvia	Paulikiene <i>et al.</i> 2021*
<i>B. pendula</i> Roth	7- 10 (monosakkaridit)		2 - 4	Liettua	Mingaila <i>et al.</i> 2020**
<i>B. pendula</i> Roth	10 - 16 (monosakkaridit)		0,3 - 0,4	Liettua	Ozolincius <i>et al.</i> 2016
<i>B. pubescens</i> Ehrh.	9 - 14 (monosakkaridit)		0,6 - 1	Liettua	Ozolincius <i>et al.</i> 2016
<i>B. pendula</i>	0,54	3,50		Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023***
<i>B. pendula</i>	3,6 - 4,3	4,9 - 6,6	0,07	Korea	Jeong <i>et al.</i> 2012
<i>B. plantyphylla</i> var. <i>japonica</i>	2,5	3,3		Korea	Jeong <i>et al.</i> 2013

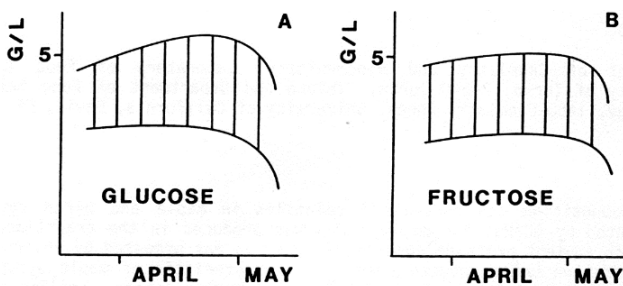
*Kokonaissokeripitoisuus 0,73 g/l, **Kokonaissokeripitoisuus 0,81 - 1,4 %.

* **Hiilihydrattien kokonaismäärä 7,0 g/l ja pelkistävien sokereiden määrä 6,2 g/l.

Sakkaroosi on disakkaridi eli sen molekyyli muodostuu kahdesta toisiinsa liittyneestä monosakkaridimolekyylisestä glukoosista ja fruktoosista (Kuva 1). Sakkaroosimolekyylisestä muodostuu pilkkoutumisen eli inverteoitumisen (hydrolyysin kautta) kautta glukoosia ja fruktoosia, joita kutsutaan myös inverttisokereiksi. Sakkaroosin pilkkoutuminen on sille tyypillinen reaktio, joka

nopeutuu lämpötilan noustessa ja pH:n laskiessa. (Combes *et al.* 1981) Fruktoosi ja glukoosi ovat pelkistäviä sokereita toisin kuin sakkaroosi. Tämä vaikuttaa mm. ei-entsymaattisiin ruskistumisreaktioihin (Maillardin reaktio ja karamelisoituminen), joihin pelkistävät sokerit osallistuvat. (Combes *et al.* 1981)

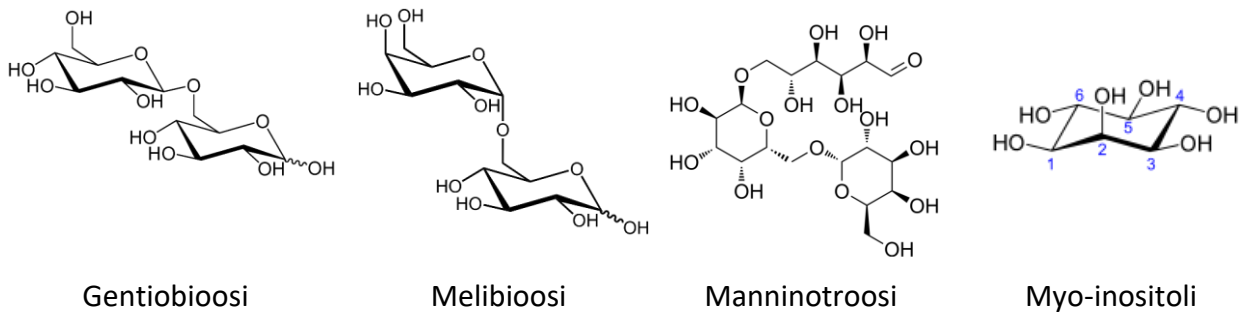
Koivumahlan sokeripitoisuus on suurimmillaan keruukauden alussa ja laskee sen jälkeen. Glukoosin ja fruktoosin pitoisuudet kasvavat keruukauden aikana, kunnes pienenevät lehtien puhjetessa (Kuva 2). Sakkaroosipitoisuus pienenee keruukauden aikana, ja joissakin tapauksissa se saattaa hävitä kokonaan. (Kallio *et al.* 1987a ja 1987c, Ozolincius *et al.* 2016) Galaktoosin (Kuva 1) pitoisuus pysyi matalana (0,01- 0,03 g/l) koko mahlan keruuajan (Kallio *et al.* 1987c). On havaittu, että mahla on makeampaa kuivan kesän ja kylmän talven jälkeen. (Ozolincius *et al.* 2016)



Kuva 2. Koivumahlan glukoosin ja fruktoosin tyypilliset muutokset keruukauden aikana (Kallio 2013)

Mahlan eri sokereiden pitoisuuksien määrittämiseen on käytetty yleensä korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) (Jeong *et al.* 2012, Kuka *et al.* 2013, Luczaj *et al.* 2014, Semjonovs *et al.* 2014, Bilek *et al.* 2015a, Carpintero *et al.* 2023). Sokereiden pitoisuuksien määrittämiseen TMS-johdoksina on käytetty kapillaarikaasukromatografia-massaspektrometriaa (GC-MS) (Kallio *et al.* 1985 ja 1987b). Myös refraktometriä menetelmiä (Merck Reflectoquant® manuals) on käytetty sokereiden määrittämiseen (Grabek-Lejko *et al.* 2017). Monosakkaridi- ja sakkaroosipitoisuuksien määrittämiseen on käytetty Bertrandin menetelmää (AOACa) (Ozolincius *et al.* 2016, Mingaila *et al.* 2020, Paulikiene *et al.* 2021).

Mahlasta on löydetty sakkaroosin lisäksi myös pieniä määriä muita oligosakkarideja, kuten gentiobioosia, melibioosia ja manninotriooosia (Kuva 3) (Semjonovs *et al.* 2014). Gentiobioosi (6-O- β -glukosyl-D-glukoosi, amygdaloosi) on disakkaridi, joka muodostuu kahdesta toisiinsa β -(1,6)-sidoksella liittyneestä D-glukoosiyksiköstä. Sitä syntyy glukoosin karamelisoituessa ja se on pelkistävä sokeri. (Nguyen *et al.* 2013) Melibioosi on disakkaridi, joka muodostuu toisiinsa liittyneistä α -(1,6)-sidoksella D-galaktoosi- ja D-glukoosiyksiköstä ja poikkeaa laktoosista kiraalisuudeltaan (El Khadem 2003). Manninotriooosi on trisakkaridi, joka koostuu kahdesta galaktoosi- ja yhdestä glukoosiyksiköstä (dos Santos *et al.* 2013). Gentiobioosi, melibioosi ja manninotriooosi ovat pelkistäviä sokereita. (Semjonovs *et al.* 2014)



Kuva 3. Gentiobioosin, melibioosin, mannonotriosisin ja myo-inositolin rakenteet.

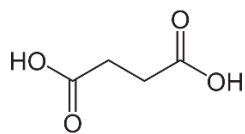
Koivumahlan on havaittu sisältävän hivenmääriä myo-inositolia (Kuva 3), joka on luonnossa eniten esiintyvä inositolin (sykloheksa-1,2,3,4,5,6-heksoli) muoto (Kallio *et al.* 1985). Myo-inositoli (*cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-sykloheksaaniheksoli) on syklinen hiilihydraatti, jossa on kuusi hydroksyyliiryhmää (sokerialkoholi). Aiemmin sitä kutsuttiin B8-vitamiiniksi, kunnes havaittiin, että sitä muodostuu glukoosista luonnostaan elimistössä (munuaiset, maksa, aivot). Nykyisin se luokitellaan vitamiinin kaltaiseksi yhdisteeksi. Myo-inositolilla on suuri merkitys solukalvon osana ja lisäksi sitä tarvitaan monityydyttämättömien rasvahappojen synteesissä sekä solujen välisessä viestinnässä. Myo-inositolille ei ole asetettu saantisuositusta, vaikka sen puutoksesta on tietyissä tapauksissa viitteitä. Inositolin makeus on puolet pöytäsokerin (sakkaroosin) makeudesta. (DiNicolantioni *et al.* 2022)

Mahlaan ja mahlatuotteisiin on joskus lisätty edullisempia sokeriruo'osta tai maissisiirapista peräisin olevia sokereita (ns. C4-sokereita). Kasveista (kukkivat kasvit ja puut) peräisin olevat sokereit ovat sen sijaan ns. C3-sokereita. Eri alkulähteistä peräisin olevat sokereit voidaan havaita hiili-isotooppitutkimuksen avulla. C3- ja C4-kasvien välillä on havaittavissa selvä ero 12C/13C-suhteessa: koivusiirappi (keskiarvo $\delta^{13}\text{C} = -25.31 \pm 0.62 \text{ ‰}$), maissista ja sokeriruo'osta peräisin olevat C4-sokereit $\delta^{13}\text{C}$ -arvo $\approx -11 - -12 \text{ ‰}$). (Peck *et al.* 2018)

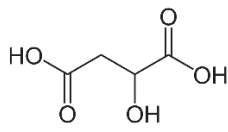
Koivumahlan liuenneen kiintoaineen kokonaispitoisuus koostuu sokerien lisäksi kivennäisaineista (esim. K, Mg, Ca), hapoista, vapaista aminohapoista ja suuresta joukosta erilaisia entsyymejä. Kiintoaineen kokonaispitoisuuden määrittämiseen käytetään epäsuoraa Brix-mittausta, jolla määritetään liuoksen ominaispaino (liuoksen tiheyden suhde veden tiheyteen). (Ozolincius *et al.* 2016, Mingaila *et al.* 2020, Paulikiene *et al.* 2021) Yksi aste Brix (1° Brix) määritellään 1 grammaksi sakkaroosia 100 grammassa vesiliuosta. Brix-asteikkoa käytetään teollisuudessa suhteellisen sokeripitoisuuden vertailuvälineenä. (Euromixers 2024) Suomalaisen koivumahlan Brix-arvo vaihtelee 0.5 - 1.2 ° Brix (Kallio 2013, Nordic Koivu 2024).

3. Orgaaniset hapot ja fosforihappo

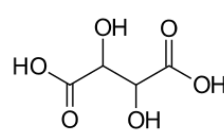
Sokereiden lisäksi koivumahla sisältää orgaanisia happoja (maksimissaan yhteensä n. 1 g/l) sekä fosforihappoa. Koivumahlan orgaaniset hapot ovat pääosin hedelmähappoja: omenahappoa, meripihkahappoa, fumaarihappoa, viinihappoa ja sitruunahappoa (Kuva 4, Taulukko 2) (Kallio *et al.* 1985, Kallio *et al.* 1987a, Jeong *et al.* 2012, Semjonovs *et al.* 2014, Nordic Koivu 2024). Myös pieniä määriä muita happoja (Taulukko 2) on havaittu: muurahaishappoa, etikkahappoa, glykolihappoa, propaanihappoa, maitohappoa ja oksaalihappoa (Kuva 4) (Kallio *et al.* 1985, Semjonovs *et al.* 2014, Carpintero *et al.* 2023). Mahlan orgaanisten happojen määrittämiseen on käytetty HPLC:ta (Carpintero *et al.* 2023) ja kapillaari-GC-MS-menetelmää (Kallio *et al.* 1985 ja 1987a).



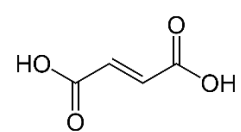
Meripihkahappo
(butaanidihappo)



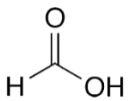
Omenahappo
(hydroksibutaanidihappo)



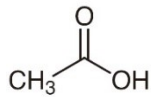
Viinihappo
(2,3-dihydroksibutaani-
dihappo)



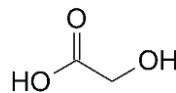
Fumaarihappo
(2-buteenidihappo)



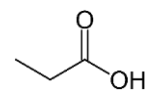
Muurahaishappo
(metaanidihappo)



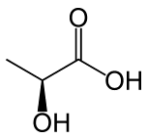
Etikkahappo



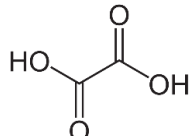
Glykolihappo
(hydroksietikkahappo)



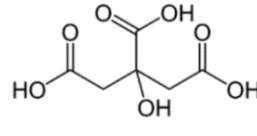
Propaanihappo



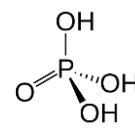
Maitohappo
(2-hydroksipropaani-
dihappo)



Oksaalihappo



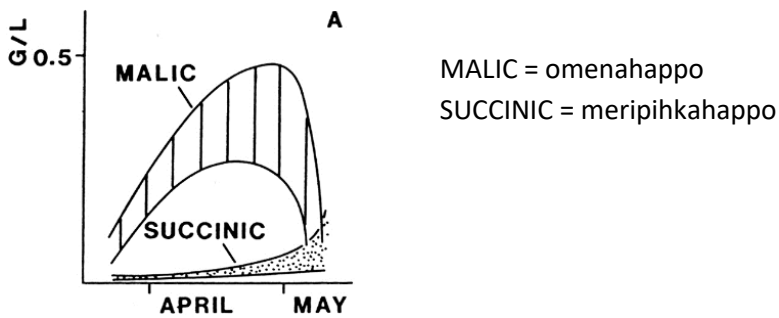
Sitruunahappo



Fosforihappo

Kuva 4. Koivumahlasta havaittujen happojen rakenteet.

Koivumahlan kemiallinen koostumus riippuu mahlan erittymisvaiheesta (Kuva 5). Koivumahlan happojen pitoisuudet kasvavat keruukauden aikana ja laskevat jälleen lehtisilmujen puhjettua (Kallio *et al.* 1987a, Jeong *et al.* 2012, Ozolicus *et al.* 2016). Erään tutkimuksen mukaan omenahapon määrä nousi keruukauden aikana 100 mg/l:sta 600 mg/l:aan ja laski nopeasti lehtien puhjetessa. Vastaava trendi havaittiin myös fosforihapolla, jota oli n. 1/10-osa omenahapon määrästä. Meripihkahapon pitoisuus kohosi 10 mg/l:sta 300 mg/l:aan ja sitruunahapon pitoisuus 5 mg/l:sta 20 mg/l:aan. Happojen pitoisuuden muutokset (lähinnä omenahappo, jota on eniten) ovat suurelta osin vastuussa koivumahlan pH:n muutoksista: keruukauden alussa pH oli lähes neutraali (7.5) ja laski sen kuluessa (5.5), kunnes taas nousi lehtien puhjetessa. Koivulajien (*Betula pendula* Roth ja *B. pubescens* Ehrh.) välillä ei havaittu merkittäviä eroja happojen pitoisuuksissa. (Kallio *et al.* 1987a)



Kuva 5. Omenahapon ja meripihkahapon tyypilliset muutokset keruukauden aikana (Kallio 2013)

Taulukko 2. Koivumahlanäytteiden happopitoisuuksia.

Happo	Pitoisuus (mg/l)	Menetelmä	Maa	Viite
Omenahappo	100 - 700	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1985
	100 - 600	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1987a
	230 - 510		Suomi	Nordic Koivu 2024
Meripihkahappo	<100	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1985
	10 - 300	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1987a
	584	HPLC	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
	20 - 50	-	Suomi	Nordic Koivu 2024
Viinihappo	0 - 1090	-	Suomi	Nordic Koivu 2024
Sitruunahappo	<100	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1985
	5 - 20	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1987a
Oksaalihappo	41,55	HPLC	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
Muurahaishappo	67,27	HPLC	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
Propionihappo	565,50	HPLC	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
Fosforihappo	<40	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1985
	10 - 60	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1987a
Fumaarihappo	hivenmäärä	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1985
Glykoli-happo	-	GC-MS	Suomi	Kallio <i>et al.</i> 1985

- = tieto puuttuu

Happojen määrän suhde sokerien määrään vaikuttaa mahlan koettuun makeuteen. Keruukauden edistyessä mahlan sokeripitoisuus laskee ja happopitoisuus kasvaa, mikä vaikuttaa mahlan makuun. Sokeri/happosuhde laskee nopeasti ensimmäisten keruuviikkojen aikana ja pysyy sen jälkeen miltei vakiona (10 - 25). (Kallio *et al.* 1987a)

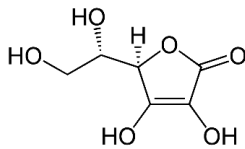
Orgaanisia happoja (0,3 % omena-, 0,5 % sitruuna- tai 0,5 % maitohappo (Kuva 4)) ja kaliumsorbaattia on myös lisätty mahlaan säilöntäaineena pidentämään mahlan käyttöikää. Orgaanisten happojen lisäys on kuitenkin vaikuttanut negatiivisesti mahlan makuun ja tämän vuoksi mahlatuotteisiin on lisätty makua parantavia lisäaineita, kuten hedelmäsiirappeja, hunajaa tai yrttiututteita. Maitohapon (0,1 %) ja kaliumsorbaatin avulla stabiloidun mahlan makua ei sen sijaan tarvinnut korjata. (Bilek *et al.* 2016a, 2018a ja 2018b)

4. Vitamiinit, fenolihdisteet ja triterpeenit

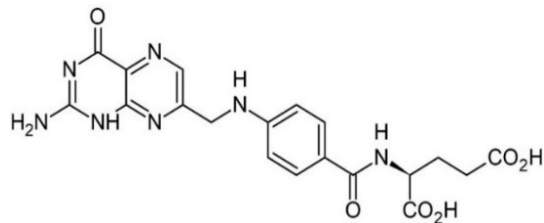
Koivumahla sisältää pieniä määriä vitamiineja: C-vitamiinia ja B-ryhmän vitamiineja (B9 ja B8 (kts. kpl 2: myo-inosotoli)). Mahla sisältää myös fenolihdisteitä ja triterpeenejä. Nämä yhdisteet ovat bioaktiivisia aineita, ja niillä on antioksidanttisia ominaisuuksia eli ne estävät haitallisia hapetusreaktiota. (Kuka *et al.* 2013)

4.1. Vitamiinit

Koivumahla sisältää C-vitamiinia eli askorbiinihappoa (Kuva 5) ja sen pitoisuus on vaihdellut 3 - 70 mg/l (Taulukko 3). Koivulajilla ja keruuajankohdalla havaittiin olevan vaikutusta mahlan askorbiinihappopitoisuuteen: Keruukauden alussa *Betula pendula Roth.* mahlan askorbiinihappopitoisuus (70 mg/l) oli 12 %:ia korkeampi kuin *Betula pubescens Ehrh.* mahlan. Intensiivisimmän mahlan erittymisen aikana askorbiinihappopitoisuus laski *Betula pendula Roth.* 2%:ia ja *Betula pubescens Ehrh.* se nousi 10 %:ia. (Ozolincius *et al.* 2016) Maatyypillä ei havaittu olevan vaikutusta mahlan askorbiinihappopitoisuuteen (Ozolincius *et al.* 2016), mutta kosteusolosuhteilla oli vaikutusta: normaaleissa kosteusolosuhteissa kasvaneiden koivujen mahlassa askorbiinihappopitoisuus (63 mg/l) oli suurempi verrattuna ajoittain kosteissa olosuhteissa kasvaneiden koivujen mahlaan (57 mg/l) (Mingaila *et al.* 2020).



Askorbiinihappo (C-vitamiini)



Foolihappo (B9-vitamiini)

Kuva 5. Askorbiinihapon ja foolihapon rakenteet.

Askorbiinihapon pitoisuuden määrittämiseen mahlasta on käytetty joko jodometrista titrausta (Kuka *et al.* 2013) tai titrausta 2,6-dikloorifenolindofenolin natriumkloridiliuoksella (AOAC 1990b) (Ozolincius *et al.* 2016, Mingaila *et al.* 2020, Paulikiene *et al.* 2021). Näistä jälkimmäisellä menetelmällä on saatu selkeästi suurempia askorbiinihapon pitoisuuksia kuin jodometrisella titrauksella (Taulukko 3).

Koivumahla sisältää myös B9-vitamiinia eli foolihappoa (Kuva 5). Foolihapon pitoisuudesta on saatavilla niukasti tutkimustietoa. Grabek-Lejko *et al.* (2017) tutkimuksessa koivumahlan foolihappopitoisuus vaihteli 3,9 - 7,1 µg/l (Taulukko 3). Koivulajilla ja kasvupaikalla havaittiin olevan vaikutusta mahlan foolihappopitoisuuteen: *B. pendula* koivujen mahlan foolihappopitoisuudet (4,4 - 7,1 µg/l) olivat korkeampia kuin *B. pubences* koivujen (3,9 µg/l). Korkein pitoisuus mitattiin teollisuusalueella kasvaneiden koivujen mahlasta. Foolihappopitoisuuden määrittämiseen käytettiin mikrobiologista määrittämenetelmää, joka perustuu siihen, että *Enterococcus hirae* -

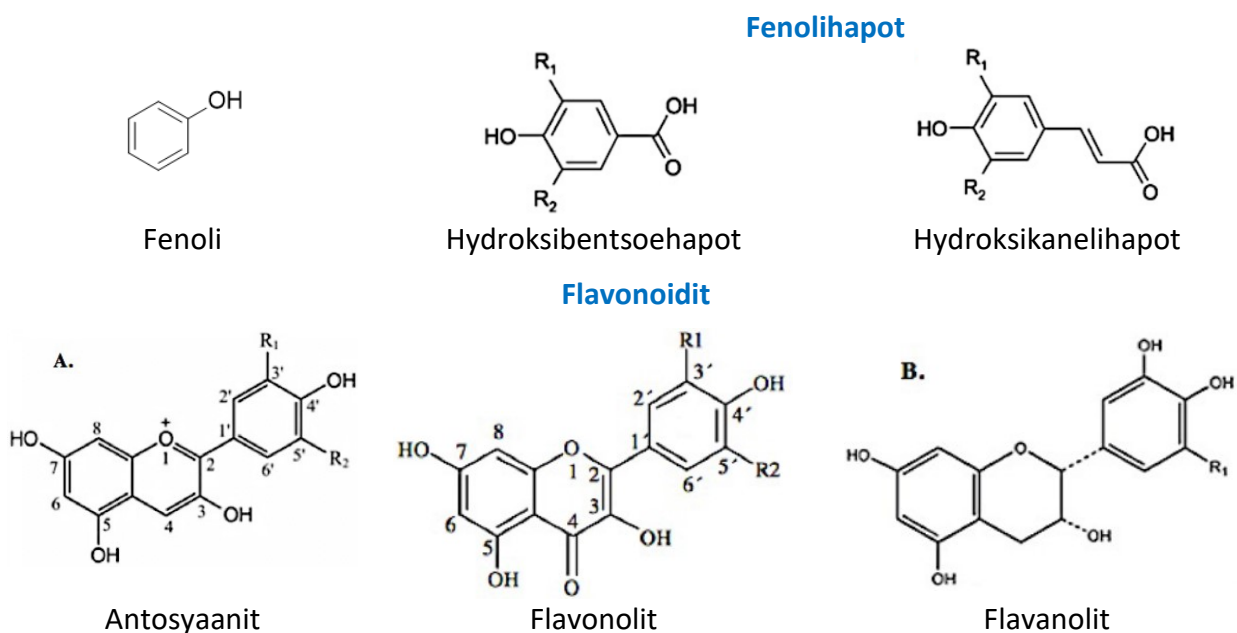
bakteeri voi kasvaa foolihappomääritysmediumissa vain, jos siihen lisätään foolihappopitoista standardia tai näytettä. (Grabek-Lejko *et al.* 2017)

Taulukko 3. Koivumahlan askorbiini- ja foolihappopitoisuudet ja fenoliyhdisteiden pitoisuuksia.

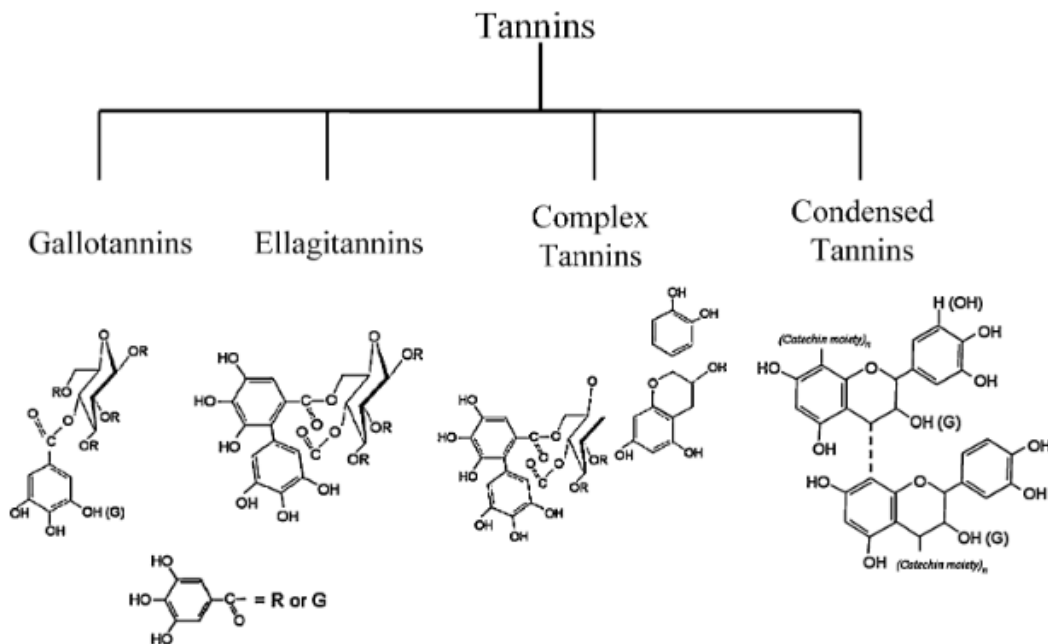
Yhdiste	Pitoisuus	Maa	Viite
Askorbiinihappo (mg/l)	3,2±0,01	Latvia	Kuka <i>et al.</i> 2013
	70	Liettua	Ozolincius <i>et al.</i> 2016
	57 - 63	Liettua	Mingaila <i>et al.</i> 2020
	58,7	Latvia	Paulikiene <i>et al.</i> 2021
Foolihappo (µg/l)	3,9 – 7,1	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
Fenoliyhdisteet (mg GAE/l)	35,4 – 55,2	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	90±10	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023

4.2. Fenoliyhdisteet

Koivumahla sisältää pieniä määriä fenoliyhdisteitä (Taulukko 3). Fenoliyhdisteet ovat ryhmä pieniä molekyyliä, joille on tunnusomaista se, että niiden rakenteessa on vähintään yksi fenoliyksikkö. Fenoli- ja polyfenoliyhdisteet voidaan jakaa kemiallisten rakenteidensa perusteella eri alaryhmiin, kuten fenolihapot (hydroksikanelihapot, hydroksibentsoehapot, Kuva 6), flavonoidit (antosyaanit, flavonolit, flavanolit, Kuva 6), tanniinit (Kuva 7), lignaanit, stilbeenit, kumariinit ja kurkumoidit. (Gan *et al.* 2019) "Kasvifenolit" ovat kasvien tuottamia luonnollisia aineenvaihduntatuotteita (metaboliitteja), joilla on hyvin monenlaisia fysiologisia tehtäviä kasveissa. Niitä tunnetaan useita tuhansia ja niiden katsotaan toimivan kasvin puolustusyhdisteinä (stressimetaboliitteina) erilaisille ympäristörasituksille (esim. valo, alhaiset lämpötilat, ravinteiden puute, taudinaiheuttajat, kasvinsyöjät), jotka voivat johtaa vapaiden radikaalien ja muiden hapettavien yhdisteiden lisääntymiseen kasveissa. (Lattanzio 2013)

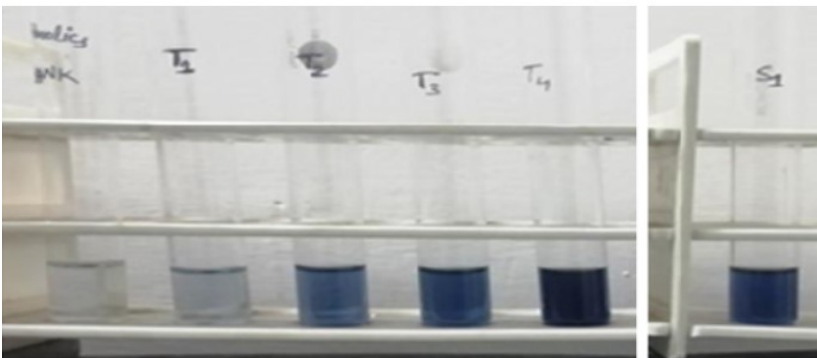


Kuva 6. Fenolin, fenoliyhdisteiden ja flavonoidien rakenteet



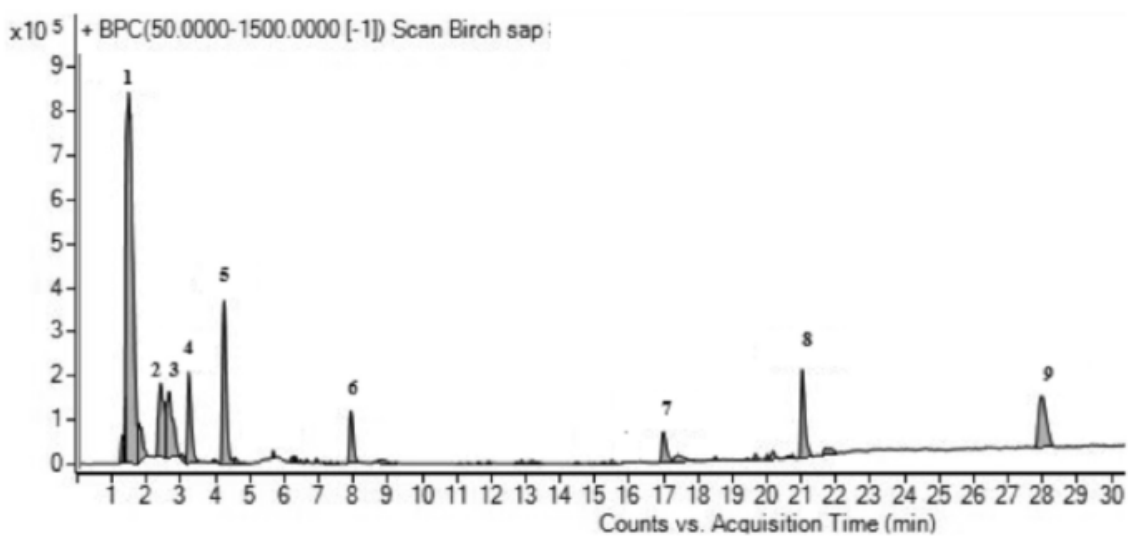
Kuva 7. Tanniinien jaottelu ja kemialliset pöyrakenteet (Aguilar *et al.* 2007)

Koivumahlan kokonaisfenolipitoisuus on vaihdellut 35 – 90 mg GAE/l (Taulukko 3). Kokonaisfenolipitoisuus on määritetty käyttämällä Folin-Ciocalteu-kolorimetristä menetelmää (Kuva 8) (Singleton *et al.* 1965) ja tulokset on ilmoitettu milligrammoina gallushappoekvivalenteja (GAE) koivumahlalitraa kohden. Grabek-Lejko *et al.* (2017) tutkimuksessa kokonaisfenolipitoisuus vaihteli 35 – 55 mg GAE/l. Tutkimuksessa havaittiin, että tehdasalueella kasvaneiden koivujen mahlan fenolisten yhdisteiden pitoisuudet olivat suurempia verrattuna muilla alueilla kasvaneisiin koivuihin. Tämä tulos korreloi antioksidanttiaktiivisuustulosten kanssa. Tutkimuksessa ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa eri koivulajeista olevien mahlojen kokonaisfenolipitoisuuksissa. (Grabek-Lejko *et al.* 2017) Carpentero *et al.* (2023) määrittämissä koivumahlan kokonaisfenoli-pitoisuudelle saatiin suurempi arvo (Taulukko 3). Koivun iän on havaittu korreloivan hyödyllisten fenoliyhdisteiden pitoisuuden kanssa: mitä vanhempi puu sitä suurempi pitoisuus. (Staniszewski *et al.* 2020)

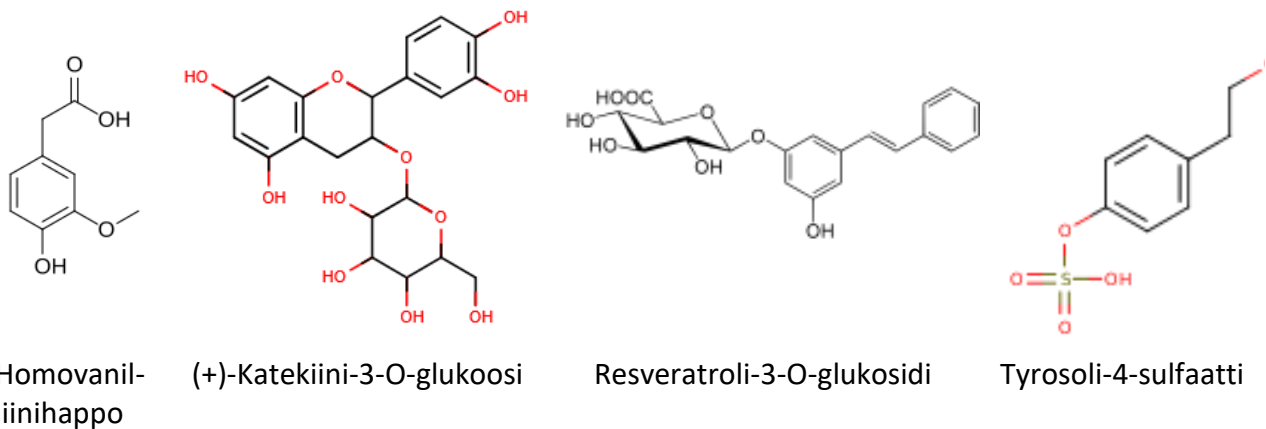


Kuva 8. Folin-Ciocalteu-menetelmän standardiliuokset (T_{1-4}) ja näyteliuos (S_1). Spektrofotometrinen mittaus (765 nm). (Baliyan *et al.* 2022)

Boroduskis *et al.* (2017) löysivät koivumahlasta (*B. pendula*) HPLC-MS-menetelmällä 55 biologisesti aktiivista yhdistettä: mm. orgaanisia happoja, vapaita aminohappoja ja fenoliyhdisteitä (Kuva 9). Fenoliyhdisteiden määrä ei ollut suuri, mutta mahla sisälsi mm. homovanilliinihappoa, (+)-katekiini-3-O-glukoosia, resveratrolin 3-O-glukosidia, tyrosolin 4-sulfaattia ja tunnistamatonta tanniinia (Kuvat 9 ja 10). Homovanilliinihappo kuuluu fenoliyhdisteisiin ja siellä flavonoidien alaryhmään. Myös resveratrolin 3-O-glukosidi kuuluu polyfenoliyhdisteisiin ja siellä stilbeeneihin. Tyrosolin 4-sulfaatti kuuluu fenoksisulfaatteihin ja luetaan muihin fenoliyhdisteisiin. (Boroduskis *et al.* 2017)



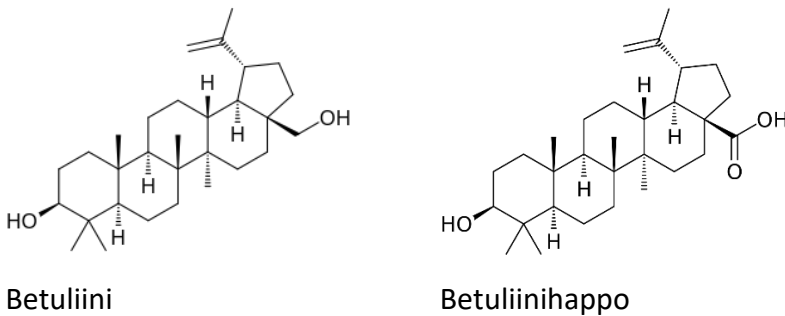
Kuva 9. Koivumahlan (*B. pendula*) HPLC-MS-kromatogrammi. Vain sellaiset piikit on numeroitu, joiden konsentraatio ylittää 2%: 1) hyvin polaarinen mahlafraktio (orgaaniset hapot, aminohapot ja tyrosolin 4-sulfaatti), 2) leusiini, 3) isoleusiini, 4) homovanilliinihappo, 5) fenyylialaniini, 6) (+)-katekiini-3-O-glukoosi, 7) betuliini, 8) resveratrolin 3-O-glukosidi, 9) tunnistamaton tanniini. (Boroduskis *et al.* 2017)



Kuva 10. Koivumahlan fenoliyhdisteitä.

4.3. Triterpeenit

Betuliinihappo ja sen luonnollinen analogi betuliini (Kuva 11) ovat lupaantyyppisiä, pentasyklisiä triterpenoideja. Näitä triterbenoideja löytyy laajalti kasvukunnasta ja varsinkin koivun kuoresta ja tuohesta. (Sousa *et al.* 2019) Ne ovat antioksidantteja (Günher *et al.* 2021) ja niillä on todettu olevan tärkeitä biologisia ominaisuuksia kuten syöpää estäviä, antiviraalisia, antibakteerisia ja malariaa estäviä vaikutuksia. (Sousa *et al.* 2019) Niitä on havaittu pieninä pitoisuuksina myös koivun mahlassa (Kuva 9) (Boroduskis *et al.* 2017).



Kuva 11. Betuliinin ja betuliinihapon rakenteet.

4.4. Antioksidanttiaktiivisuus

Antioksidantit ovat yhdisteitä, jotka ehkäisevät hapettumista neutralisoimalla vapaita radikaaleja. C-vitamiinilla, foolihapolla, fenoliyhdisteillä ja triterpeeneillä on antioksidanttisia ominaisuuksia. Antioksidanttiaktiivisuuden määrittämiseen käytetään useita eri menetelmiä, jotka perustuvat joko vetyatomien luovuttamiseen (ORAC, HORAC, TRAP, TOSC-testit) tai vapaiden radikaalien sieppaamiseen (CUPRAC, FRAP-testit) tai näiden yhdistelmään (ABTS, DPPH -testit). (Muteanu *et al.* 2021)

Grabek-Lejko *et al.* (2017) tutkimuksessa koivumahlan antioksidanttiaktiivisuutta mitattiin kahdella eri menetelmällä (ABTS ja FRAP). Näistä ABTS-määrittäminen mittaa antioksidanttien suhteellista kykyä poistaa vesifaasissa muodostunut ABTS (ABTS = 2,2'-atsinobis(3-etylibentsotiatsoliini-6-sulfoni-happo) verrattuna Trolox-standardiin (Trolox = 6-hydroksi-2,5,7,8-tetrametyylikromaani-2-karboksylihappo, vesiliukoinen E-vitamiinianalogi). FRAP-määrittäminen taas mittaa antioksidanttien kykyä pelkistää rauta(III)-ligandikompleksi rauta(II)-kompleksiksi happamassa liuoksessa verrattuna Trolox-standardiin. ABTS-menetelmällä saatiin suurempia antioksidanttiaktiivisuusarvoja kuin FRAP-menetelmällä (Taulukko 3). Antioksidanttiaktiivisuuden havaittiin olevan suurin tehdasalueella kasvaneilla koivuilla verrattuna muilla alueilla kasvaneisiin, mikä voi olla seurausta tehdasalueella kasvaneisiin koivuihin kohdistuvasta ympäristöstressistä. Antioksidanttiaktiivisuus oli hieman suurempi *B. pendula* koivujen mahlassa verrattuna *B. pubescens* koivujen mahlaan, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkittävä. (Grabek-Lejko *et al.* 2017)

Taulukko 4. Koivumahlan antioksidanttiaktiivisuuksia.

Parametri	Menetelmä	Yksikkö	Arvo	Maa	Viite
Antioksidanttiaktiivisuus	ABTS Trolox	($\mu\text{mol/l}$)	294 – 481	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
Antioksidanttiaktiivisuus	FRAP Trolox	($\mu\text{mol/l}$)	40,0 – 72,0	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
Antioksidanttiaktiivisuus	DPPH	(%)	28,5	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
Antioksidanttipitoisuus		QE (mg/l)	0,35 \pm 0,03	Latvia	Kuka <i>et al.</i> 2013

Carpintero *et al.* (2023) käyttivät koivumahlan antioksidanttiaktiivisuuden määrittämiseen DPPH-menetelmää (Taulukko 3). DPPH-liuos (DPPH = 2,2-difenyyl-1-pikryylihydratsyyli) on väriltään violettiä ja absorboi valoa voimakkaasti 517 nm:n aallonpituudella. Antioksidanttien vaikutuksesta DPPH:sta muodostuu DPPH-H-muotoa, joka absorboi vähemmän 517 nm:n aallonpituudella. Antioksidanttiaktiivisuus voidaan laskea spektrofotometrasta mittaustuloksista seuraavasti:

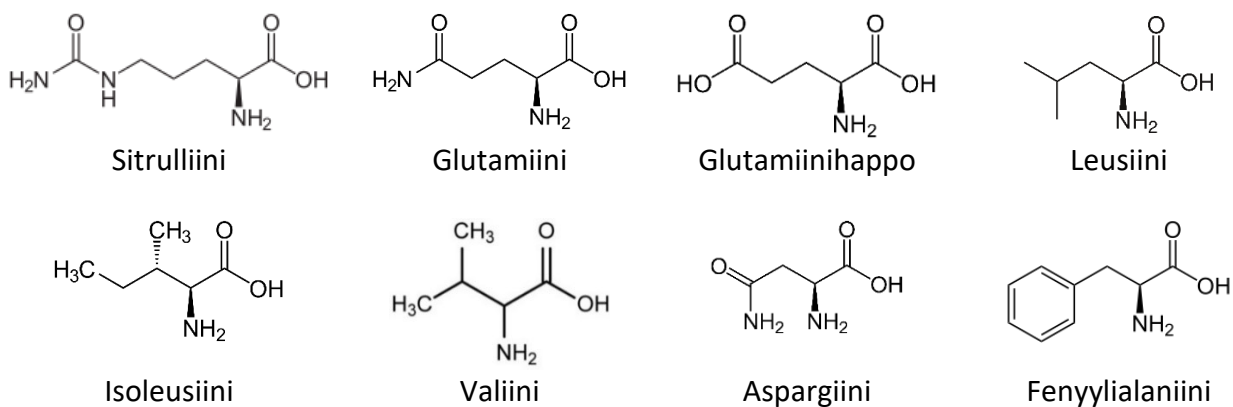
$$\text{Antioksidanttiaktiivisuus-\%} = (A_{\text{kontr}} - A_{\text{näyte}}) / A_{\text{kontr}} \times 100,$$

missä A_{kontr} = DPPH-kontrolliliuoksen absorbanssi ja $A_{\text{näyte}}$ = näytteen + DPPH:n absorbanssi 517 nm. (Carpintero 2023) Tulos on ilmaistu prosentteina, joten sitä on vaikeaa verrata ABTS- ja FRAP-menetelmien tuloksiin, joiden yksikkö on $\mu\text{mol/l}$.

Kuka *et al.* (2013) käyttivät myös DPPH:ta antioksidanttipitoisuuden määrittämiseen koivumahlasta, mutta pitoisuus määritettiin kalibraatiokuvaajan avulla. Flanonoleihin kuuluvaa kversetiiniä käytettiin standardiaineena kalibraatiokuvaajan spektrofotometrisessä määrittämisessä 517 nm:n aallonpituudella. Näytteen antioksidanttipitoisuus ilmaistiin kversetiiniekvivalentteina QE (mg/l). Koivumahlan antioksidanttipitoisuus (0,35 QE mg/l, Taulukko 3) oli n. puolet vaahteramahlan antioksidanttipitoisuudesta.

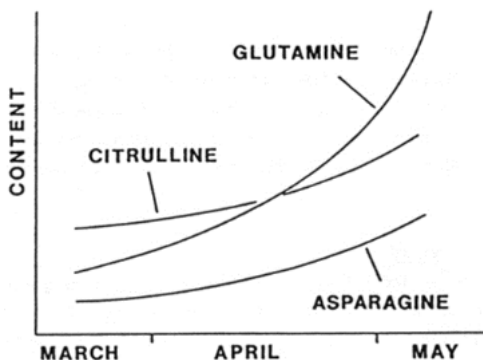
5. Aminohapot

Koivumahla sisältää pieniä pitoisuuksia vapaita aminohappoja (Grabek-Lejko *et al.* 2017, Kuka *et al.* 2013, Sancho *et al.* 2022). Raudus- ja hieskoivun mahlasta on tunnistettu ainakin 15 erilaista aminohappoa. Useimmiten havaittuja ovat sitrulliini, glutamiini, glutamiinihappo, isoleusiini, valiini ja aspargiini (Kuva 12), joita on 92 % - 97 % kokonaisaminohappomäärästä. (Ahtonen *et al.* 1989) Myös leusiinia, ja fenyyialaniinia (Kuva 12) on löydetty koivumahlasta (Boroduskis *et al.* 2017). Koivumahlan kokonaisaminohappopitoisuus vaihteli suomalaisessa koivumahlassa (*B. pendula*) 100 – 500 mg/l. (Ahtonen *et al.* 1989) Japanilaiselle koivumahlalle (*B. platyphylla var. japonica* ja *B. verruco*) on mitattu pienempiä kokonaisaminohappopitoisuuksia (15 – 63 mg/l). (Jiang *et al.* 2001).

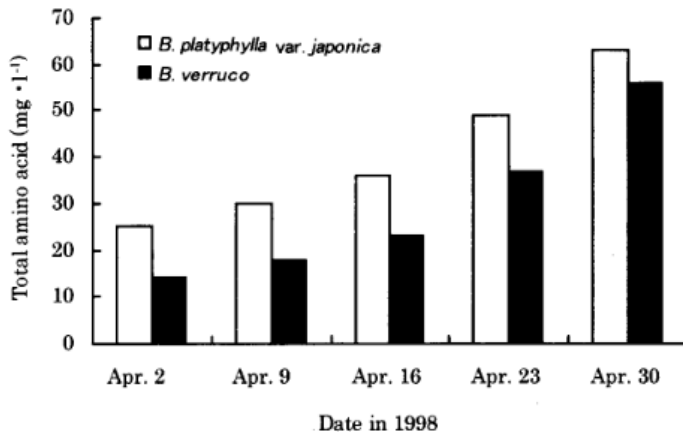


Kuva 12. Koivumahlan aminohappojen rakenteita.

Mahlan aminohappojen pitoisuudet kasvavat keruukauden edetessä (Ahtonen ja Kallio 1989, Jiang *et al.* 2001). Suomalaisessa mahlassa kuuden pääaminohapon pitoisuudet kohosivat huhtikuussa ja kaksinkertaistuivat kuun loppupuolella (Kuva 13). Eniten kasvoi glutamiinin pitoisuus, joka oli lopulta 40 % aminohappojen kokonaismäärästä. (Ahtonen ja Kallio 1989) Japanilaisen koivumahlan kokonaisaminohappopitoisuus (Kuva 14) kasvoi keruukauden aikana *B. platyphylla var. japonica* koivulla 25 mg/l:sta 63 mg/l:aan ja *B. verruco* koivulla 15 mg/l:sta 55 mg/l:aan (Jiang *et al.* 2001).



Kuva 13. Joidenkin aminohappojen tyypilliset muutokset koivumahlan keruukaudella (Kallio 2013).



Kuva 14. Kokonaisaminohappopitoisuudet huhtikuussa (Jiang *et al.* 2001).

Mahlan vapaiden aminohappojen identifiointiin on käytetty kapillaari-GC-MS-menetelmää, jossa aminohapot on analysoitu pentafluoropropionianhydridi-isopropyyliestereinä (Ahtonen ja Kallio 1989). Aminohappojen kokonaispitoisuuden määrittämiseen on käytetty GC-MS:aa (Ahtonen ja Kallio) ja hydrolysoituille mahlanäytteille aminohappoanalysaattoria (Jiang *et al.* 2001) sekä formoliluvun määrittämistä (Kuka *et al.* 2013). Formolilukua käytetään aminohappojen määrän mittana mm. hedelmämehuissa ja viineissä. Formoliluvun määrittämisessä mahlaan lisättiin formaldehydiä, joka reagoi aminoryhmien kanssa. Reaktiossa vapautuneet vetyionit titrattiin natriumhydroksidilla, kunnes pH = 8,1. Formoliluvuksi saatiin $0,25 \pm 0,01$ (0,1 M NaOH ml/100 ml). (Kuka *et al.* 2013). Edellä mainittujen julkaisujen lisäksi koivumahlan aminohappojen identifiointista ja pitoisuuksista on saatavilla vain niukasti tietoa.

Aminohapot osallistuvat Maillardin reaktioihin ja vaikuttavat kuumentamalla koivumahlasta valmistettavan koivusiirapin aistittaviin ominaisuuksiin (Ahtonen ja Kallio 1989). Pätzold ja Brückner (2005) havaitsivat venäläisen koivumahlanäytteen sisältävän D-alaniinia ($5,6 \pm 0,4$ %D, %D = D/(D+L)) tutkiessaan mekanismia, jolla L-aminohapoista voisi muodostua D-aminohappoenantiomeerejä Maillardin reaktion palautuvissa vaiheissa. D-aminohapot mitattiin ja tunnistettiin pentafluoripropionianhydridiisopropyyliestereinä enantioselektiivisellä GC-SIM-MS:lla. (Pätzold ja Brückner 2005)

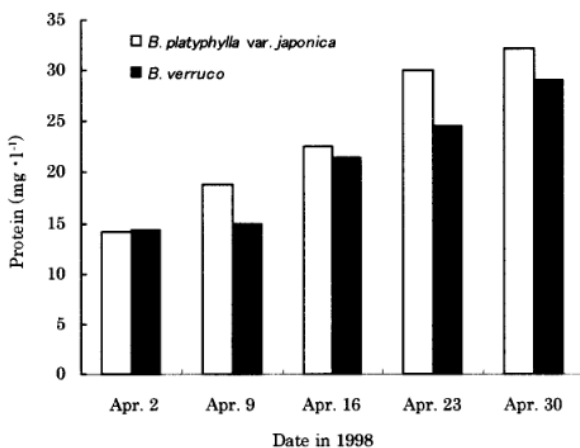
6. Proteiinit

Koivumahlan on havaittu sisältävän vapaiden aminohappojen lisäksi myös proteiineja, jotka koostuvat useita aminohappoyksiköistä (Kuka *et al.* 2013, Jiang *et al.* 2001, Jeong *et al.* 2012, Sancho *et al.* 2022). Koivumahlan kokonaisproteiinipitoisuus on vaihdellut tyypillisesti 3 – 70 mg/l (Taulukko 5), mutta myös suurempia pitoisuuksia on mitattu latvialaiselle (Kuka *et al.* 2013) ja puolalaiselle (Grabek-Lejko *et al.* 2017) koivumahlalle.

Taulukko 5. Koivumahlan kokonaisproteiinipitoisuuksia

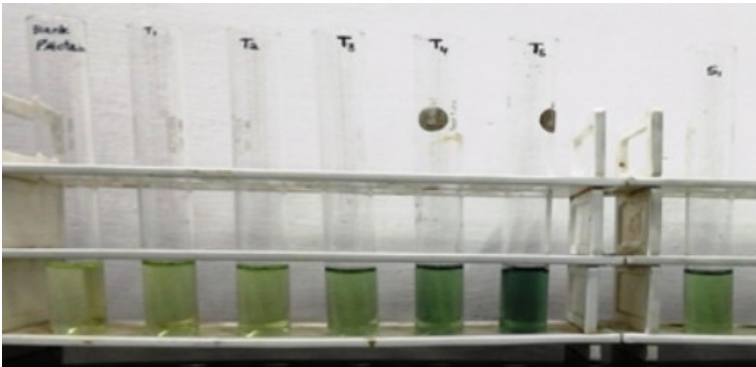
Maa	Koivulaji	Proteiinit (mg/l)	Menetelmä	Viite
Suomi	<i>B. pendula</i>	40 ja 70	tieto puuttuu	Kallio <i>et al.</i> 1995
Tanska	<i>B. pendula</i>	3 – 60	Pierce™ 660 nm Protein Assay Kit	Sancho <i>et al.</i> 2022
Latvia	<i>B. pendula</i>	127±2	Lowry (1951)	Kuka <i>et al.</i> 2013
Latvia	<i>B. pendula</i>	12.9	Spektrofotometrinen	Nikolajeva <i>et al.</i> 2018
Puola	<i>B. pendula</i>	272-287	Lowry (1951)	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. pubescens</i>	307		
Japani	<i>B. verrucosa</i>	15 – 28	Bradford (1976)	Jiang <i>et al.</i> 2001
	<i>B. platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	15 – 35		
Korea	<i>B. platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	3.4 – 32.4	Kjeldahl	Jeong <i>et al.</i> 2012

Koivumahlan kokonaisproteiinipitoisuus kasvaa (Kuva 15) keruukauden edistyessä. Tämä saattaa johtua siitä, että kauden edetessä puusolukossa mahlan typpipitoisuus kasvaa (Kallio *et al.*, 1995). Kasvien typpivarat sijaitsevat organelleissa, joita käytetään proteiinien tuottamiseen. Kevään kuluessa puusolukko mobilisoituu ja jakaa typpiyhdisteet juurista versoihin, mikä saattaa selittää proteiinien suuren pitoisuuden sadonkorjuujakson lopussa (Sauter *et al.* 1992). Keruukauden lopussa proteiinipitoisuuden on havaittu olevan kaksinkertainen (Jiang *et al.* 2001), viisinkertainen (Sancho *et al.* 2022) tai jopa kymmenkertainen (Jeong *et al.* 2012) kauden alkuun verrattuna.



Kuva 15. Kokonaisproteiinipitoisuudet huhtikuussa (Jiang *et al.* 2001)

Kokonaisproteiinipitoisuuden määrittämiseen on käytetty Lowryn (Kuva 16) (Lowry et al. 1951) ja Bradfordin (Bradford 1976) menetelmiä käyttäen standardina naudan seerumin albumiinia (Kuka et al. 2013, Grabek-Lejko et al. 2017, Jiang et al. 2001). Kokonaisproteiinipitoisuuden määrittämiseen on käytetty myös Kjeldahlin menetelmää (Jeong et al. 2012), spektrofotometrillä määrittystä (Nikolajeva et al. 2018) ja proteiininmäärityskittejä (Sancho et al. 2022). Hayes (2020) on julkaissut yhteenvetoartikkelin eri menetelmien eduista ja haasteista.



Kuva 16. Lowryn menetelmän standardiliuokset (T₁₋₅) ja näyteliuos (S₁). Spektrofotometrinen mittaus 660 nm). (Baliyan et al. 2022)

Koivumahla proteiiniprofiilin on myös havaittu muuttuvan keruukauden aikana ja sitä on tutkittu SDS-PAGE:n (natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi) avulla, joka erottelee proteiinit niiden koon mukaan, ja proteiinit määritettiin automaattisella proteiinisekvensaattorilla. (Jiang et al. 2001, Sancho et al. 2022). Japanilaisessa mahlassa havaittiin molemmilla tutkituilla koivulajeilla (*Betula platyphylla* var. *japonica* ja *Betula verrucosa*) 10 proteiinijuovaa 20 – 30 kDa-alueella. Taulukossa 6 on esitetty mahlan proteiinien kausivaihtelu. (Jiang et al. 2001)

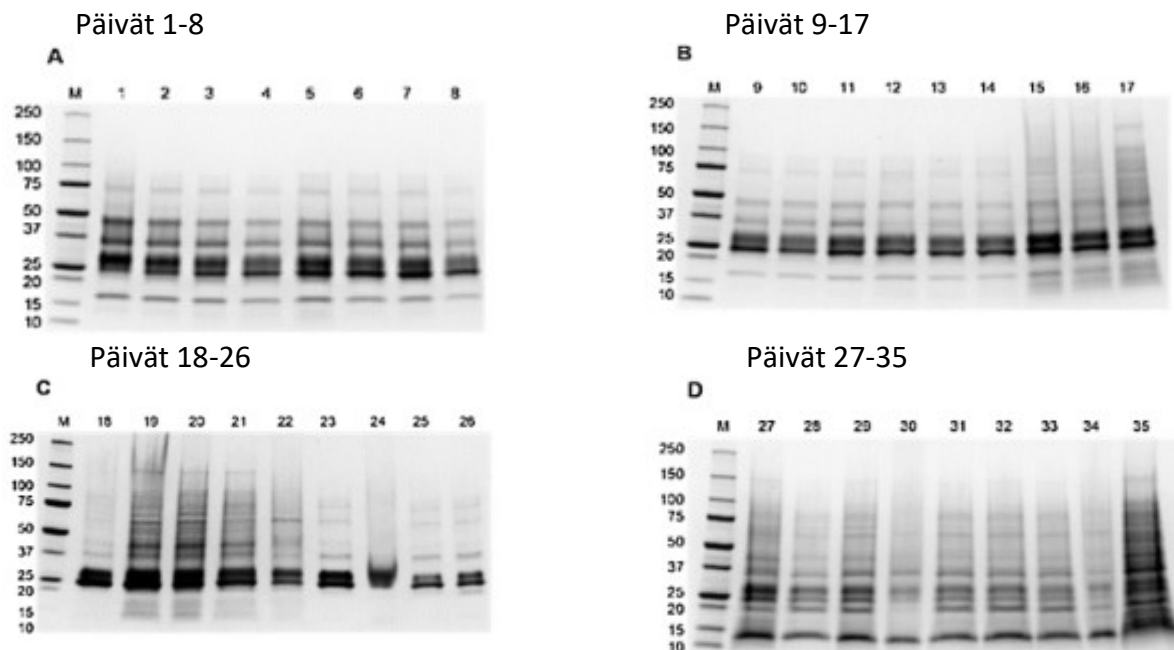
Taulukko 6. Koivumahlan proteiinikoostumus keruukauden aikana (Jiang et al. 2001).

Molecular mass (kDa)	Abundance ^a									
	<i>B. platyphylla</i> var. <i>japonica</i>					<i>B. verrucosa</i>				
	Apr. 2	Apr. 9	Apr. 16	Apr. 23	Apr. 30	Apr. 2	Apr. 9	Apr. 16	Apr. 23	Apr. 30
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+		+	+	+	+	++
22		+	+	++	++	++	++	+	++	++
25	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
27	+	+	+	+++	+++	++	++	++	++	++
30	+	++	+	++	++	++	++	++	+++	+++
35		+	+	++	+	+			+	+
68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70		+	+	+	+	+		+	+	+
75		+	+					+	+	+

^a Abundance = runsaus: +++ =pääfraktiot, ++ runsaat fraktiot, + = näkyvät fraktiot

Proteiinien N-terminaaliaminohapposekvenssianalyysit paljastivat, että *B. platyphylla* var. *japonican* mahlan 22 kDa proteiini oli hyvin samankaltainen kuin *B. verrucosan* mahlan 25 kDa:n proteiinin (97 % samankaltaisuus). Lisäksi näillä proteiineilla oli suhteellisen suuri samankaltaisuus (65% - 74 %) joidenkin muista kasvilähteistä (pellava, maito, tomaatti) eristettyjen proteiinien, jotka ovat antifungaalisia proteiineja. (Jiang *et al.* 2001)

Myös Sancho *et al.* (2022) tutkimuksessa proteiiniprofiilin havaittiin myös muuttuvan (*B. pendula* ja *B. platyphylla*) keruukauden aikana (Kuva 17). Suurimmat muutokset tapahtuivat proteiinien pienikokoisella alueella, mutta runsaimmat proteiinit pysyvät tasaisena koko kauden ajan kuten aiemassa Kallio *et al.* (1995) tutkimuksessa. Kahden hallitsevan proteiinin koot olivat n. 25 ja 30 kDa (Kuva 17 A- D). Keruukauden alussa proteiinit olivat pääasiassa kokoa 17 – 75 kDa (Kuva 17 A ja B) ja lopussa ne vaihtelivat 12-150 kDa (Kuva 17 C ja D). Lisäksi havaittiin, että n. 17 kDa:n proteiinia oli läsnä kauden alussa, mutta se melkein katosi kauden lopussa. Kaksi proteiinia (noin 12 kDa ja 20 kDa) näyttivät myös ilmestyvän päivästä 27 lähtien (Kuva 17 D). Se ovatko havaitut muutokset seurausta proteiinien proteolyysistä vai seurausta uusien proteiinien ilmentymisestä keruukauden aikana vaatii lisäselvityksiä. Tarkemmissa tutkimuksessa 2D-ektroforeesilla eristetyistä fraktiosta tunnistettiin LC-MS/MS:lla kaksikymmentä proteiinia, jotka liittyvät kasvien puolustamiseen taudinaiheuttajia ja abioottista stressiä vastaan (Liite 1). (Sancho *et al.* 2022) Abioottisella stressillä tarkoitetaan elottomien tekijöiden negatiivista vaikutusta eläviin organismeihin tietyssä ympäristössä.



Kuva 17. Koivumahlan SDS-PAGE-analyysi keruukauden eri päivinä (y-akselilla proteiinien koko kDa:na, M = massakontrolli). (Sancho *et al.* 2022)

7. Metallit ja muut alkuaineet

Koivunmahla sisältää ravitsemuksen kannalta arvokkaita kivennäisaineita. Kivennäisaineet jaetaan makro- ja mikrokivennäisaineisiin elimistössä esiintyvän määrän ja päivittäisen tarpeen mukaan. Metallien pitoisuuksien määrittämiseen on käytetty monia eri menetelmiä. Suurempien pitoisuuksien määrittämiseen on yleensä käytetty liekkiatomiabsorptiospektrometriaa (LAAS), induktiivisesti kytkettyä plasma-atomiemissiospektrometriaa (ICP-OES) ja kaupallisia määrittyskittejä spektrofotometriin määrittäisiin. Pienten pitoisuuksien määrittämiseen on käytetty mm. grafiittiuuni-AAS:aa, ICP-massaspektrometriaa (ICP-MS) ja kokonaisheijastusröntgenfluoresenssispektrometriaa (TXRF), jotka ovat herkempiä analyysitekniikoita. Fosforin ja rikin kokonaispitoisuuden määrittämiseen on käytetty ICP-OES-, ICP-MS- ja TXRF-menetelmiä ja anionipitoisuuksien määrittämiseen ionikromatografiaa (IC) tai määrittyskittejä spektrofotometriseen määrittäisiin.

7.1. Kalium, kalsium, magnesium ja natrium

Makrokivennäisaineiden päivittäinen tarve on yli 100 mg. Niitä ovat mm. kalsium (Ca), magnesium (Mg), kalium (K) ja natrium (Na). Kalsium on yleisin kivennäisaine elimistössä ja se on merkittävä luun rakennetekijä. Kalsiumioni vaikuttaa solujen toimintaan monin tavoin. Magnesium osallistuu lukuisiin aineenvaihduntatapahtumiin ja monien entsyymien toiminta riippuu siitä. Natrium ja kalium ovat ihmiselimistön pääasialliset elektrolyytit ja ovat nestetasapainon ensisijaisia säätelijöitä. Natrium- ja kaliumionit osallistuvat hermo- ja lihasimpulssien kulkuun. (Schwab 2024)

Koivumahla sisältää eniten kaliumia ja kalsiumia (K: 10.6 – 166 mg/l, Ca: 5.5 – 150 mg/l), kun taas magnesiumin ja natriumin pitoisuudet (Mg: 2.9 – 24.9 mg/l, Na: 0.02 – 7.5 mg/l) ovat pienempiä (Taulukko 7). Keruuajankohta vaikuttaa niiden pitoisuuksiin ja suurimmat pitoisuudet on havaittu mahlan voimakkaimman erittymisen vaiheessa (Ozolincius *et al.* 2016). Koivumahlaa ei voi pitää merkittävänä kaliumin, kalsiumin, magnesiumin ja natriumin lähteenä (Bilek *et al.* 2017a), jos mahlan pitoisuuksia vertaa saantisuositukseen (K: 2.9 – 3.5 g/vrk, Ca: 0.8 – 0.9 g/vrk ja Mg: 280 – 350 mg/vrk) (Ruokavirasto 2014). Natriumin tarpeeksi on arvioitu 1.5 g/vrk (Strohm *et al.* 2018) ja suositeltavaksi saanniksi alle 2 g Na/vrk (Schwab 2024).

Taulukko 7. Koivumahlan päämineraalialkuaineiden (Ca, K, Mg, Na) pitoisuuksia.

Alkuaine	Koivulaji	Pitoisuus (mg/l)	Menetelmä	Maa	Viite
Ca	<i>B. pendula</i>	41.0 – 53.3	Spektrofotometria	Latvia	Kuka <i>et al.</i> 2013
	<i>B. pendula</i>	5.52 – 17.28	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b
	<i>B. pendula</i>	14.552 – 43.643	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2017a
	<i>B. pendula</i>	162.6 – 212.8	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. pendula</i>	30.8	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2018a
	<i>B. pendula</i>	48	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
	<i>B. pubescens</i>	15.12	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b
	<i>B. pubescens</i>	217.9	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. platphylla</i> var. <i>japonica</i>	25.82	ICP-OES	Korea	Jeong <i>et al.</i> 2013
	<i>Betula sap</i>	42 – 150	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014
<i>Betula sap</i>	33 – 85	tieto puuttuu	Suomi	Nordic Koivu 2024	
K	<i>B. pendula</i>	41.1 – 66.4	Spektrofotometria	Latvia	Kuka <i>et al.</i> 2013
	<i>B. pendula</i>	10.56 – 23.76	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b
	<i>B. pendula</i>	76.40 – 624.22	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2017a
	<i>B. pendula</i>	107.4 – 179.1	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. pendula</i>	90.7	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2018a
	<i>B. pendula</i>	74	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
	<i>B. pubescens</i>	18.08	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b
	<i>B. pubescens</i>	149.1	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. platphylla</i> var. <i>japonica</i>	30.10	ICP-OES	Korea	Jeong <i>et al.</i> 2013
	<i>Betula sap</i>	54 – 142	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014
<i>Betula sap</i>	72 – 166	tieto puuttuu	Suomi	Nordic Koivu 2024	
Mg	<i>B. pendula</i>	4.42 – 14.36	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b
	<i>B. pendula</i>	2.901 – 7.298	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2017a
	<i>B. pendula</i>	18.6 – 31.2	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. pendula</i>	23.88	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2018a
	<i>B. pendula</i>	11	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
	<i>B. pubescens</i>	13.82	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b
	<i>B. pubescens</i>	24.9	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. platphylla</i> var. <i>japonica</i>	11.9	ICP-OES	Korea	Jeong <i>et al.</i> 2013
	<i>Betula sap</i>	7 – 22	tieto puuttuu	Suomi	Nordic Koivu 2024
Na	<i>B. pendula</i>	0.56 – 0.59	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b
	<i>B. pendula</i>	0.098 – 0.160	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2017a
	<i>B. pendula</i>	0.16 – 1.97	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. pendula</i>	0.73	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2018a
	<i>B. pubescens</i>	0.55	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b
	<i>B. pubescens</i>	nd*	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. platphylla</i> var. <i>japonica</i>	7.51	ICP-OES	Korea	Jeong <i>et al.</i> 2013
	<i>Betula sap</i>	0.02 – 0.6	tieto puuttuu	Suomi	Nordic Koivu 2024

7.2. Magnaani, sinkki, kupari ja rauta

Koivumahla sisältää myös ravitsemuksen kannalta arvokkaita mikrokivennäisaineita. Mikrokivennäisaineita on elimistössä hyvin vähän ja niiden päivittäinen tarve on muutamia milligrammoja tai sen alle. Niitä ovat mm. rauta (Fe), sinkki (Zn), mangaani ja kupari (Cu). (EFSA 2006, NIH 2022a NIH 2022b, NIH 2023a, THL 2024, Schwab 2024) Koivumahlassa suurimmat pitoisuudet (Taulukko 8) on havaittu mangaanille (0.11 – 13 mg/l) ja sinkille (0.014 – 4.96 mg/l). Kuparin ja raudan pitoisuudet mahlassa ovat niihin verrattuna pienempiä: kupari (0 – 0.82 mg/l) ja rauta (0 – 0.304 mg/l). Ravitsemuksen kannalta mahlan Mn-, Zn- ja Cu-pitoisuudet ovat korkeita (Bilek et al. 2017a), jos niitä vertaa saantisuosituksiin, ja varsinkin jos mahlasta valmistetaan koivusiirappia.

Mangaani (Mn) on ihmiselle tarpeellinen hivenalkuaine ja edellytys monien entsyymien toiminnalle. Mn:n vähäinen saanti voi lisätä tiettyjen sairauksien riskiä (luun demineralisaatio, diabetes). Magnaanin puutos on ihmisillä erittäin harvinaista. (EFSA 2006, NIH 2022a, THL 2024) Mangaanin liikasaannilla voi olla haitallisia vaikutuksia varsinkin lapsille. On havaittu, että haitallisinta on juomaveden kautta saatu mangaani. Sen sijaan ravinnon kautta saatu mangaani imeytyy elimistössä huomattavasti todennäköisemmin sen vuoksi, että ravinnon muut komponentit vähentävät sen imeytymistä. Lapsilla on tutkimuksissa havaittu haittavaikutuksia, jos juomaveden mangaanipitoisuus ylittää 100 µg/l ja tämän vuoksi WHO on antanut juomaveden mangaanille ehdollisen ohjearvo 80 µg/l. (THL 2024) Suomessa Sosiaali- ja terveysministeriö (STM 2023) on asettanut juomaveden Mn:n laatusuosituksesksi tiukemman 50 µg/l pitoisuuden (Taulukko 9). Mangaanille ei ole olemassa saantisuositusta tai turvallisen saannin rajaa. (EFSA 2006, THL 2024)

Sinkki (Zn) on ihmiselle tarpeellinen hivenalkuaine ja se osallistuu moniin kehon toimintoihin mm. solumetabolian, proteiini- ja DNA-synteesi, immuunipuolustus. Zn-puutos voi vaikuttaa mm. ihoon, luustoon, ruuansulatus- ja lisääntymiselimistöön, keskuhermostoon ja immuunipuolustukseen. Haitallisen suurien Zn-pitoisuuksien ei voida saada ravinnon kautta, mutta lisäravinteista saadut korkeat Zn-määrät (142 mg/vrk) voivat häiritä Mg-tasapainoa. Aikuisilla päivittäinen saantisuositus on 7-13 mg Zn/vrk ja suurin turvallisen saannin raja on aikuisille 40 mg/vrk (Ruokavirasto 2014, NIH 2022a).

Kupari (Cu) on ihmiselle tärkeä hivenaine, jota keho käyttää moniin toimintoihin mm. energian tuotanto, lihakset ja verisuonet. Cu myös auttaa ylläpitämään hermostoa ja immuunipuolustusta ja aktivoi geenejä. Cu-puutos on harvinaista, mutta voi aiheuttaa mm. anemiaa, korkeaa kolesterolia, lihaskivertä, osteoporoosia ja epänormaalia rasva-ainemetaboliaa. Krooninen altistuminen suurille Cu-pitoisuuksille voi aiheuttaa maksavaurioita ja ruuansulatuselimistön oireita. Cu-myrkytys on harvinaista terveille yksilöillä (Wilsonin sairaus), mutta oireita on havaittu sellaisilla henkilöillä, joiden juomavesi on sisältänyt paljon kuparia. Euroopan unioni (EU 2020) on asettanut juomaveden Cu:n maksimipitoisuudeksi 2.0 mg/l (Taulukko 9) ja USA:n ympäristönsuojeluvirasto (EPA) on suositellut raja-arvoksi 1.3 mg/l (NIH 2022b). Aikuisilla päivittäinen saantisuositus on 0.9 mg Cu/vrk (Ruokavirasto 2014, NIH 2022b) ja suurin turvallisen saannin raja on 10 mg Cu/vrk (NIH 2022b).

Taulukko 8. Koivumahlan mikromineraalialkuaineiden (Cu, Fe, Mn, Zn) pitoisuuksia.

Alkuaine	Koivulaji	Pitoisuus (mg/l)	Menetelmä	Maa	Viite	
Cu	<i>B. pendula</i>	0 – 0.04	Spektrofotometria	Latvia	Kuka <i>et al.</i> 2013	
	<i>B. pendula</i>	0.15 – 0.39	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b	
	<i>B. pendula</i>	0.00039-0.0042	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2017a	
	<i>B. pendula</i>	0.048 – 0.138	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017	
	<i>B. pendula</i>	0.01176	GFAAS	Puola	Bilek 2018a	
	<i>B. pendula</i>	0.03-0.78	LAAS	Puola	Staniszewksi <i>et al.</i> 2020	
	<i>B. pendula</i>	0.035	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023	
	<i>B. pubescens</i>	0.48	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b	
	<i>B. pubescens</i>	0.089	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017	
	<i>B. platphylla</i> var. <i>japonica</i>	0.82	ICP-OES	Korea	Jeong <i>et al.</i> 2013	
	<i>Betula sap</i>	0.019 – 0.029	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014	
Fe	<i>B. pendula</i>	0 - 0.1	Spektrofotometria	Latvia	Kuka <i>et al.</i> 2013	
	<i>B. pendula</i>	0.00924 - 0.02184	GFAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2017a	
	<i>B. pendula</i>	0.198 - 0.249	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017	
	<i>B. pendula</i>	0.01546	GFAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2018a	
	<i>B. pendula</i>	0.097	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023	
	<i>B. pubescens</i>	0.304	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017	
	<i>B. platphylla</i> var. <i>japonica</i>	0.61	ICP-OES	Korea	Jeong <i>et al.</i> 2013	
		<i>Betula sap</i>	0.05 - 0.29	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014
	<i>Betula sap</i>	0 - 0.16	tieto puuttuu	Suomi	Nordic Koivu 2024	
Mn	<i>B. pendula</i>	0.5 - 0.52	Spektrofotometria	Latvia	Kuka <i>et al.</i> 2013	
	<i>B. pendula</i>	1.93 - 4.10	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017	
	<i>B. pendula</i>	1.043	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2018a	
	<i>B. pendula</i>	0.02 - 6.15	LAAS	Puola	Staniszewksi <i>et al.</i> 2020	
	<i>B. pendula</i>	5.2	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023	
	<i>B. pubescens</i>	7.92	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017	
	<i>B. platphylla</i> var. <i>japonica</i>	2.36	ICP-OES	Korea	Jeong <i>et al.</i> 2013	
		<i>Betula sap</i>	0.11 - 6.16	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014
		<i>Betula sap</i>	1.5 - 13	tieto puuttuu	Suomi	Nordic Koivu 2024
Zn	<i>B. pendula</i>	0.88 - 1.85	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b	
	<i>B. pendula</i>	0.014 - 0.906	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2017a	
	<i>B. pendula</i>	2.97 - 4.12	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017	
	<i>B. pendula</i>	1.2	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2018a	
	<i>B. pendula</i>	0.11 - 1.64	LAAS	Puola	Staniszewksi <i>et al.</i> 2020	
	<i>B. pendula</i>	1.5	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023	
	<i>B. pubescens</i>	1.29	LAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2015b	
	<i>B. pubescens</i>	4.50	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017	
	<i>B. platphylla</i> var. <i>japonica</i>	3.82	ICP-OES	Korea	Jeong <i>et al.</i> 2013	
		<i>Betula sap</i>	0.90 - 4.96	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014
		<i>Betula sap</i>	0.2 - 1.8	tieto puuttuu	Suomi	Nordic Koivu 2024

Rauta (Fe) on mineraali, jota keho tarvitsee kasvuun ja kehitykseen. Fe:aa on hemoglobiinissa, joka kuljettaa happea keuhkoista muualle kehoon, ja sitä on myös myoglobiiniproteiinissa, joka kuljettaa happea lihaksiin. (NIH 2023a, Schwab 2023) Fe:aa tarvitaan myös tiettyjen hormonien valmistuksessa. Fe-puutos aiheuttaa monia ongelmia mm. anemiaa ja se ei ole harvinaista lapsilla,

naisilla, raskaana olevilla ja kasvissyöjillä. Liian suuri Fe:n saanti voi olla haitallista ja aiheuttaa ruuansulatuselimistön ongelmia, ja erittäin suuret annokset (sadoista tuhansiin mg:hin) voivat aiheuttaa vakavia seurauksia. (NIH 2023a) Suomessa hedelmällisessä iässä olevilla naisilla Fe:n saantisuositus (Schwab 2023) on 15 mg/vrk (USA 18 mg/vrk, NIH 2023a) ja miehillä ja iäkkäämmillä naisilla 9 mg/vrk (USA: 8 mg/vrk, NIH 2023a). Suomessa raskaana oleville naisille ei ole erillistä suositusta (USA: 27 mg/vrk, NIH2023a). Raudan suurin hyväksyttävä päiväsaanti aikuiselle on Suomessa 60 mg/vrk (Schwab 2024). USA:n terveystieteiden tutkimuskeskus on määritellyt raudan suurimmaksi turvalliseksi saanniksi 45 mg/vrk (NIH 2023a).

Taulukko 9. Juomaveden laatuvaatimukset ja -suositukset

Alkuaine tai ioni	Maksimipitoisuus	Viite	Alkuaine tai ioni	Maksimipitoisuus	Viite
Laatuvaatimukset:			Laatusuositukset:		
Cd	5.0 µg/l	EU 2020, STM 2023	Fe	200 µg/l	STM 2023
Cr	25 µg/l	EU 2020, STM 2023	Mn	50 µg/l	STM 2023
Cu	2.0 mg/l	EU 2020, STM 2023	Na	200 mg/l	STM 2023
Ni	20 µg/l	EU 2020, STM 2023	Kloridi (Cl ⁻)	250 mg/l	STM 2023
Pb	5.0 µg/l	EU 2020, STM 2023	Sulfaatti (SO ₄ ²⁻)	250 mg/l	STM 2023
nitraatti (NO ₃ ⁻)	50 mg/l	EU 2020, STM 2023	Ammonium (NH ₄ ⁺)	0.50 mg/l	STM 2023
nitriitti (NO ₂ ⁻)	0.50 mg/l	EU 2020, STM 2023			

7.3. Kromi, rubidium, seleeni ja strontium

Kromi (Cr) on todennäköisesti ihmiselle välttämätön hivenalkuaine. Kromin biokemiallista tehtävää ei ole osoitettu varmuudella, mutta se vaikuttaa hiilihydraatti-, lipidi- ja proteiinimetaboliaan insuliinin toiminnan kautta. (NIH 2022c) Kromilla on luonnossa kaksi pysyvää hapetusastetta (+III ja +VI), joista Cr(VI) on eliöille myrkyllistä ja Cr(III) tarpeellista. Kasveissa kromi esiintyy vain hapetusasteella +III, koska kasvit ottavat kromin maaperästä sitraattikomplekseina, joita Cr(VI) ei muodosta. (Verma nee Juneja *et al.* 2008) Koivumahlan Cr-pitoisuus on vaihdellut 0.2 – 4.13 µg/l (Taulukko 10). Cr(III):lle ei ole olemassa virallista saantisuositusta tai raja-arvoa. Epävirallinen suositus Cr(III):lle on aikuisille miehille 35 mg/vrk ja naisille 25 µg/vrk (NIH 2022c) ja turvallisen määrän ylärajalle 0.15 mg/kg rp/vrk. (EFSA 2006) Euroopan unioni (EU 2020) on asettanut juomaveden Cr:n maksimipitoisuudeksi 25 µg/l (Taulukko 9).

Rubidiumia (Rb) löytyy useimmista elintarvikkeista. Rb on alkalimetalli ja sillä on samalaiset biokemialliset ominaisuudet kuin kaliumilla. Vaikka rubidiumilla ei ole tunnettua biologista tehtävää, Rb⁺ on läsnä melkein kaikissa biologisissa systeemeissä, koska se pystyy vaihtumaan helposti K⁺:n kanssa. (Roberts *et al.* 2016) Latvialaisen koivumahlan Rb-pitoisuus on vaihdellut 20 – 280 µg/l (Taulukko 10). (Vincevica-Caile 2014)

Taulukko 10. Koivumahlan kromi- (Cr), rubidium- (Rb), seleeni- (Se) ja strontiumpitoisuudet (Sr).

Alkuaine	Koivulaji	Pitoisuus (µg/l)	Menetelmä	Maa	Viite
Cr	<i>B. pendula</i>	0.2 – 4.13	GFAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2017b
	<i>B. pendula</i>	<LOD*	GFAAS	Puola	Bilek <i>et al.</i> 2018a
	<i>B. pendula</i>	0.26	GFAAS	Puola	Staniszewski <i>et al.</i> 2020
	<i>B. pendula</i>	0.24	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
Rb	<i>Betula sap</i>	20 – 280	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014
Se	<i>B. pendula</i>	<0.000	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
Sr	<i>Bentula sap</i>	20 – 280	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014

* = alle toteamisrajan (Limit of Detection)

Seleeni on ihmiselle tarpeellinen hivenalkuaine ja sen tehtävät liittyvät proteiinimetaboliaan. Se-puutos ei ole yleistä, mutta sitä voi esiintyä maissa, joiden maaperässä ei ole paljon seleeniä (NIH2024), kuten esim. Suomessa. Suomessa seleenin saantisuositus on miehille 90 µg/vrk ja naisille 75 µg/vrk (Schwab 2024). USA:ssa saantisuositus on alhaisempi: 55 µg/vrk aikuisille (NIH 2024). Liian suuri Se-saanti voi aiheuttaa myrkytysoireita ja turvallisen määrän yläraja on aikuisille 400 µg/vrk (NIH 2024). Koivumahlan seleenipitoisuuksista on saatavilla vain vähän luotettavaa tietoa ja yleensä pitoisuus on ollut alle määritysrajan (Taulukko 10) (Carpintero *et al.* 2023).

Strontium (Sr) on maa-alkalimetalli ja ihmiskehossa se käyttäytyy samalla tavoin kuin kalsium. Suurin osa strontiumista päätyy luun pinnalle. Strontiumilla ei ole haittavaikutuksia ihmiselle niillä pitoisuuksilla, joita sitä luonnosta yleensä löytyy, mutta korkeilla pitoisuuksilla voi olla haittavaikutuksia luuston ja hampaiden kehitykseen. (ATSDR 2004) Latvialaisen koivumahlan Sr-pitoisuus on vaihdellut 20 – 280 µg/l (Taulukko 10). (Vincevica-Caile 2014) Strontiumille ei ole olemassa saantisuosituksia tai raja-arvoa. USA:n ympäristönsuojeluvirasto (EPA) suosittelee, että juomaveden Sr-pitoisuus ei saisi ylittää 4 mg/l. (ATSDR 2004)

7.4. Haitalliset raskasmetallit (Cd, Ni ja Pb)

Kasvien haitalliset raskasmetallit ovat päätyneet niihin maaperästä. Pitoisuudet ovat yleensä suurempia teollisuusalueiden ja teiden läheisyydessä (Genchi *et al.* 2020, Collin *et al.* 2022, Charkiewicz *et al.* 2023). Koivumahlan raskasmetallipitoisuuksia on tutkittu ja pitoisuudet ovat vaihdelleet paljon (Taulukko 11). Koivumahla saattaa olla merkittävä raskasmetallien lähde joissakin tapauksissa ja varsinkin jos mahlasta valmistetaan koivusiirappia. Kasvupaikalla ja keruuajankohdalla on ollut vaikutusta raskasmetallien pitoisuuksiin ja erot ovat olleet jopa puukohtaisia. Mahlatuotteiden tasalaatuisuuden ja toksikologisen turvallisuuden vuoksi eri puista, eri alueilta ja eri aikoina kerätyt mahlat kannattaa yhdistää ennen käyttöä. (Ozolicus *et al.* 2016, Bilek *et al.* 2017a, Staniszewski *et al.* 2020, Charkiewicz *et al.* 2023)

Taulukko 11. Haitallisten raskasmetallien pitoisuudet koivumahlassa.

Alkuaine	Koivulaji	Pitoisuus (µg/l)	Menetelmä	Maa	Viite
Cd	<i>B. pendula</i>	1.66 - 4.2	GFAAS	Puola	Bilek et al. 2016c
	<i>B. pendula</i>	0.55 - 4.03	GFAAS	Puola	Bilek et al. 2017b
	<i>B. pendula</i>	<LOD*	GFAAS	Puola	Bilek et al. 2018a
	<i>B. pendula</i>	0.12 - 3.01	GFAAS	Puola	Staniszewski et al. 2020
Ni	<i>B. pendula</i>	0 - 300	Spektrofotometria	Latvia	Kuka et al. 2013
	<i>B. pendula</i>	2.57 - 12.51	GFAAS	Puola	Bilek et al. 2017b
	<i>B. pendula</i>	52.61	GFAAS	Puola	Bilek et al. 2018a
	<i>B. pendula</i>	0.39 - 40.92	GFAAS	Puola	Staniszewski et al. 2020
	<i>Betula sap</i>	20 - 160	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014
Pb	<i>B. pendula</i>	<LOD*	GFAAS	Puola	Bilek et al. 2017b
	<i>B. pendula</i>	<LOD*	GFAAS	Puola	Bilek et al. 2018a
	<i>B. pentula</i>	4.93 - 35.45	GFAAS	Puola	Staniszewski et al. 2020

* = alle toteamisrajan (Limit of Detection)

Kadmium (Cd) on yksi myrkyllisimmistä alkuaineista, joille ihminen voi altistua ympäristöstään. Cd:ia kertyy ihmiskehoon, sillä sen puoliintumisaika on pitkä, jopa 16 - 30 vuotta. Cd voi aiheuttaa elinvaurioita ja sen pääkohde on munuaiset, jotka ovat myös kadmiumin vaikutuksille herkempiä. Cd on karsinogeenista ja pitkäaikainen altistuminen voi johtaa erilaisiin sairauksiin. Erilaisten syöpien lisäksi sillä voi olla yhteyttä hermoston sairauksien syntyyn (esim. Alzheimer, Parkinson, Huntington, MS-tauti). Uskotaan myös, että jotkin keuhkosairaudet ja korkea verenpaine ovat yhteydessä pitkäaikaiseen altistumiseen pienille määrille Cd:ia. On tunnettua, että ihmiskehon Cd-määrä vaihtelee alueittain. Ravinto on tupakoimattomille ihmisille lähes ainoa Cd-lähde, jos mahdollista työperäistä altistusta ei oteta huomioon. (Charkiewicz et al. 2023) Koivumahlan kadmiumpitoisuus on vaihdellut 0.12 - 4.2 µg/l (Taulukko 11). Suurimmat pitoisuudet on mitattu teollisuusalueiden läheisyydestä (Bilek et al. 2016c). Kadmiumin siedettävän viikkosaannin yläraja (TWI) on 25 µg/kg rp/viikko (Ruokavirasto 2020). Aikuisten hyväksyttäväksi kadmiumin saanniksi on YK:n Elintarvike- ja maatalousvirasto (FAO) ja Maailman terveysjärjestö (WHO) suositellut n. 0.4 - 0.5 mg Cd/viikko (60 -70 µg/vrk. (Charkiewicz et al. 2023). Euroopan unioni (EU 2020) on asettanut juomaveden Cd:n maksimipitoisuudeksi 5.0 µg/l (Taulukko 9).

Nikkeliä (Ni) löytyy useimmista ruoka-aineissa. Sen puoliintumisaika (17 - 39 tuntia) on huomattavasti lyhyempi kadmiumiin ja lyijyyn verrattuna. Nikkeli on ihmiselle myrkyllistä, karsinogeenista ja genotoksista. Pitkäaikainen Ni-altistus voi aiheuttaa ihmiselle lukuisia haittavaikutuksia kuten allergiaa, verisuoni- ja munuaissairauksia, keuhkofibroosia sekä keuhko- ja nasaalisyöpää. (Zambelli et al. 2016, Genchi et al. 2020, Becum et al. 2022) Koivumahlan nikkelpitoisuus on vaihdellut 0 - 300 µg/l (Taulukko 11). Nikkelin siedettävä päiväsaanti (TDI) on 2.8 µg/kg rp/vrk (Ruokavirasto 2020). Euroopan elintarviketurvallisuusviranomainen (EFSA) on määritellyt nikkelin TDI-arvoksi 13 µg/kg rp/vrk (EFSA 2020). Euroopan unioni (EU 2020) on asettanut juomaveden Ni:n maksimipitoisuudeksi 20 µg/l (Taulukko 9).

Lyijy (Pb) on myrkyllisyytensä ja karsinogeenisuutensa lisäksi myös neurotoksinen aine. Altistuminen Pb:lle voi vaikuttaa useisiin kehon järjestelmiin ja on erityisen haitallista pienille lapsille ja hedelmällisessä iässä oleville naisille. Pb jakautuu kehossa aivoihin, maksaan, munuaisiin ja luihin. Lyijy varastoituu hampaisiin ja luihin, missä se voi kertyä ajan myötä. Pb:n puoliintumisaika ihmisen

luustossa on 2 - 3 vuotta. Lyijyä vapautuu vereen raskauden aikana ja siitä tulee kehittyvän sikiön altistumisen lähde. Koivumahlan Pb-pitoisuus on vaihdellut 0 - 35.45 µg/l (Taulukko 11). Lyijylle ei ole altistumistasoa, jolla sen tiedettäisiin olevan aiheuttamatta haitallisia vaikutuksia. Tämän vuoksi Pb:lle ei ole voitu määrittellä turvallista siedettävää päiväsaantia (TDI) tai viikkosaantia (TWI) ja aiemmat ehdolliset arvot on kumottu. (Collin *et al.* 2022, WHO 2023). Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirastolääkevirasto (FDA) on asettanut pulloitetuille vesille lyjyn raja-arvoksi 5 µg/l, mikä on tiukempi kuin juomaveden raja-arvo (15 µg/l) (FDA 2024). Euroopan unioni (EU 2020) on asettanut juomaveden Pb:n maksimipitoisuudeksi 5.0 µg/l (Taulukko 9).

7.5. Fosfori, rikki ja typpi

Koivumahlan sisältämien fosforin ja rikin kokonaispitoisuuksia on tutkittu. Määrittäminen menetelminä on käytetty happohajotetuille näytteille joko ICP-OES:aa tai ICP-MS:aa. TXRF-menetelmällä pitoisuudet on voitu määrittää suoraan mahlanäytteestä. Koivumahlan P-pitoisuus on vaihdellut 3 – 41 mg/l ja rikin 5-12 mg/l (Taulukko 12). Koivumahlaa ei voi pitää merkittävänä fosforin ja rikin lähteenä, jos vertaa mitattuja pitoisuuksia saantisuosituksiin.

Taulukko 12. Fosforin ja rikin kokonaispitoisuuksia koivumahlassa.

Alkuaine	Koivulaji	Pitoisuus (mg/l)	Menetelmä	Maa	Viite
P	<i>B. pendula</i>	7.0 - 23.5	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>B. pendula</i>	9.2	ICP-MS	Espanja	Carpintero <i>et al.</i> 2023
	<i>B. pubescens</i>	35.0	ICP-OES	Puola	Grabek-Lejko <i>et al.</i> 2017
	<i>Betula sap</i>	3 - 41	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014
	<i>Betula sap</i>	5 - 16	tieto puuttuu	Suomi	Nordic Koivu 2024
S	<i>Betula sap</i>	5 - 12	TXRF	Latvia	Vincevica-Caile 2014

Fosfori on ihmiselle välttämätön makrokivennäisaine. Fosfori osallistuu moniin fysiologisiin prosesseihin kuten solun energiakiertoon ja kehon happoemästasapainon säätelyyn. Fosforia löytyy luista, hampaista, solukalvoista, DNA:sta ja RNA:sta. (EFSA 2020, NIH 2023) Fosfori ja kalsium liittyvät toisiinsa, koska hormonit, kuten D-vitamiini ja lisäkilpirauhashormoni, säätelevät molempien kivennäisaineiden aineenvaihduntaa. Lisäksi fosfori ja kalsium muodostavat hydroksiapatiittia, joka on luuston ja hammaskiilteen päärakennekomponentti. (NIH 2023) Fosforia on luontaisesti lähes kaikissa elintarvikkeissa pääasiassa fosfaatteina tai fosfaattiestereinä (EFSA 2020, NIH 2023). Fosforin päivittäinen saantisuositus aikuisille on 700 mg/vrk. (NIH 2023)

Rikki (S) on elintärkeä alkuaine, jota kaikki elävät olennot tarvitsevat, koska se on osa proteiineja (esim. kysteiini, metioniini, homokysteiini ja tauriini) ja muita bio-orgaaniset aineita. Se on ihmiskehon kolmanneksi yleisin mineraali ja kuudenneksi runsain makromineraali rintamaidossa. Rikkiä löytyy luontaisesti lähes kaikista elintarvikkeista ja erilaisia rikkiyhdisteitä käytetään lisäaineina esim. parantamaan säilyvyyttä. (Hewlings 2019, Dordevic *et al.* 2023) Rikille ei ole olemassa päivittäistä saantisuositusta. Sen sijaan saantisuosituksia löytyy rikkiä sisältäville aminohapoille, esim. metioniinille suositellaan 14 mg/kg rp/vrk. (Hewlings *et al.* 2019)

Koivumahlojen anionipitoisuuksia ovat tutkineet Bilek *et al.* (2016b) ionikromatografialla (IC) ja Kuka *et al.* (2013) spektrofotometrisesti käyttäen kaupallisesti saatavilla olevia määrittyskittejä. Fosfaatin (PO_4^{3-}) pitoisuus koivumahlassa oli hieman yli 2 mg/l (Taulukko 13). *Betula pendula* mahlan sulfaattipitoisuus (SO_4^{2-}) oli korkeampi (4.9 - 36.1 mg/l) kuin *Betula pubescens* (0 - 2.4 mg/l).

Taulukko 13. Koivumahlojen anioni- ja ammoniumpitoisuuksia.

Anioni	Koivulaji	Pitoisuus (mg/l)	Menetelmä	Viite
Fosfaatti	<i>Betula pendula</i>	2.06 - 2.36	Määrittyskiti	Kuka <i>et al.</i> 2013
Sulfaatti	<i>Betula pendula</i>	34.0 - 36.1	Määrittyskiti	Kuka <i>et al.</i> 2013
	<i>Betula pendula</i>	4.863 - 10.228	IC	Bilek <i>et al.</i> 2016b
	<i>Betula pubescens</i>	nd* - 2.403	IC	Bilek <i>et al.</i> 2016b
Kloridi	<i>Betula pendula</i>	nd* - 9.0	Määrittyskiti	Kuka <i>et al.</i> 2013
	<i>Betula pendula</i>	5.918 - 7.592	IC	Bilek <i>et al.</i> 2016b
	<i>Betula pubescens</i>	3.886 - 15.394	IC	Bilek <i>et al.</i> 2016b
Nitraatti	<i>Betula pendula</i>	3.40	Määrittyskiti	Kuka <i>et al.</i> 2013
	<i>Betula pendula</i>	nd*	IC	Bilek <i>et al.</i> 2016b
	<i>Betula pubescens</i>	nd* - 2.782	IC	Bilek <i>et al.</i> 2016b
Nitriitti	<i>Betula pendula</i>	0.008 - 0.012	Määrittyskiti	Kuka <i>et al.</i> 2013
Ammonium	<i>Betula pendula</i>	nd* - 0.050	Määrittyskiti	Kuka <i>et al.</i> 2013

nd* = ei havaittu (*not detected*)

Koivumahlan kloridipitoisuus (Cl⁻) vaihteli 0 – 15.4 mg/l (Taulukko 13). Kloridi on ihmiselle välttämätön ravintoaine, joka osallistuu neste- ja elektrolyyttitasapainoon, ja sitä tarvitaan solujen normaaliin toimintaan. Kloridia saadaan riittävästi ruokavaliossa, sillä sitä esiintyy luontaisesti elintarvikkeissa ja lisätään niihin ruokasuolana maun, rakenteen ja säilyvyyden parantamiseksi. Kloridin arvioitu tarve on aikuisilla 2.3 g/vrk (Strohm *et al.* 2018, EFSA 2020). Turvallista ylärajaa saannille ei ole voitu asettaa (EFSA 2020). Euroopan unioni (EU 2020) on asettanut juomaveden kloridinlaatusuosituksen 250 mg/l (Taulukko 9).

Koivumahlan nitraatti- (NO_3^-), nitriitti- (NO_2^-) ja ammoniumpitoisuudet (NH_4^+) ovat olleet pieniä tai alle määrittysrajan (Taulukko 13). Suuret nitraatti- ja nitriittimäärät voivat haitata hapenkuljetusta elimistössä. Nitriittialtistuksen on myös epäilty lisäävän diabeteksen, sepelvaltimotaudin sekä syövän riskiä. Valtaosa nitraattialtistuksesta saadaan luontaisista lähteistä kuten vihanneksista, hedelmistä ja vedestä. Nitraattia ja nitriittiä käytetään myös elintarvikelisiä aineina torjumaan ruokamyrkytyksiä aiheuttavien bakteerien kasvua. Suomalaisten nitriittialtistuksen pääasiallinen lähde ovat makkarat ja sitä löytyy myös juomavedestä. Hyväksyttävän päiväsaannin enimmäisraja on nitraatille 3.7 mg/kg rp/vrk ja nitriitille 0.07 mg/kg rp/vrk. (EFSA 2017, Ruokavirasto 2019) Euroopan unioni (EU 2020) on asettanut juomaveden nitraatin maksimipitoisuudeksi 50 mg/l ja nitraatin 0.5 mg/l (Taulukko 9).

8. Kirjallisuusviitteet

- Aguilar, C.N., Rodriguez, R., Gutierrez-Sanchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L.A., Ramirez-Coronel, A., Contreras_Esquivel, J.C., "Microbial tannases: advances and perspectives", *Appl. Microbial. Biotechnol.*, 76 (2007) 47-59. DOI [10.1007/s00253-007-1000-2](https://doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2)
- Ahtonen, S., Kallio, H., "Identification and seasonal variations of amino acids in birch sap used for syrup production", *Food Chem.*, 33 (1989), 125–132. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(89\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0308-8146(89)90115-5)
- AOAC 1990a: (The Association of Official Agricultural Chemists). Sucrose in Fruits and Fruit Products. In Official Methods of Analysis, 15th ed.; Helrich, K., Ed.; AOAC Inc.: Arlington, Quezon City, QC, Canada, 1990; 922p.
- AOAC 1990b: AOAC (The Association of Official Agricultural Chemists). Vitamin C (Ascorbic Acid) in Vitamin Preparations and Juice. In Official Methods of Analysis, 15th ed.; Helrich, K., Ed.; AOAC Inc.: Arlington, Quezon City, QC, Canada, 1990; 1058p.
- ATSDR, "Public health statement: strontium", 2004, CAS#; 7440-24-6. <https://www.cdc.gov/TSP/PHS/PHS.aspx?phs=654&toxid=120>
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R.P., Chang, C-M., "Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*", *Molecules*, 27 (2022) 1326. <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254. DOI: [10.1006/abio.1976.9999](https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999)
- Becum, W., Rai, S., Banerjee, S., Bhattacharjee, S., Mondal, M.H., Bhattari, A., Saha, B., "A comprehensive review on the sources, essentially and toxicological profile of nickel", *RSC Adv.*, 12 (2022) 9139. DOI: [10.1039/d2ra00378c](https://doi.org/10.1039/d2ra00378c)
- Bilek, M., Stawarczyk, K., Siembida, A., Strzemski, M., Olszewski, M., Cieslik, E., "Zawartość cukrów w sokach drzewnych z terenu Podkarpacia (Content of sugars in tree saps from Podkarpacie region)" *Żywn. Nauk. Technol. Ja.*, 6 (2015a) 53-63. https://wydawnictwo.pttz.org/wp-content/uploads/2016/01/05_Bilek.pdf
- Bilek, M., Stawarczyk, K., Kuzniar, P., Cieslik, E., "Content of selected minerals and inorganic anions in tree saps from Podkarpacie region. *Żywn. Nauk. Technol. Ja.*, 3 (2015b) 138-147. DOI: [10.15193/zntj/2015/100/046](https://doi.org/10.15193/zntj/2015/100/046)
- Bilek, M., Vietoris, V., Ilko, V., "Shelf life extension and sensory evaluation of birch tree sap using chemical preservatives", *Potravinarstvo*, 10 (2016a) 499-505, DOI: [10.5219/649](https://doi.org/10.5219/649)
- Bilek, M., Stawarczyk, K., Kuzniar, P., Olszewki, M., Kedziora, M., Cieslik, E., "Evaluation of the content of inorganic anions in tree saps", *J. Elem.*, 21 (2016b) 1277-1288. DOI: [10.5601/jelem.2015.20.4.1048](https://doi.org/10.5601/jelem.2015.20.4.1048)
- Bilek, M., Kuzniar, P., Cieslik, E., "Cadmium content in the drinking birch sap collected from the agriculture area", *Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine*, 19 (2016c) 31-35. <https://www.environmentmed.pl/Kadm-w-pitnym-soku-brzozowym-z-terenu-rolniczego,113156,0,2.html>
- Bilek, M., Szwer W., Kuzniar P., Stawarczyk K., Kocjan R., "Time-related variability of the mineral content in birch tree sap", *J. Elem.*, 22 (2017a) 497-515. DOI: [10.5601/jelem.2016.21.3.1245](https://doi.org/10.5601/jelem.2016.21.3.1245)
- Bilek M., Szwer W., Kocjan R., "Heavy metals (Pb, Cd, Cr, Ni) content as a potential risk factor, limiting birch tree sap usefulness", *Post. Fitoter.*, 18 (2017b) 183-189.
- Bilek, M., Wawer, J., Szwer W., Slowik, K., Sosnowski, A., "Birch sap concentrate as a potential modern food product", *Econtechmod.*, 7 (2018a) 5-9. https://www.researchgate.net/publication/327623482_Birch_sap_concentrate_as_a_potential_modern_food_product_Koncentrat_soku_brzozowego_jako_nowoczesny_srodek_spozywczy

Bilek, M., Sadej, M., Raczy, M., Rebisz, A., Sosnowski, S., "Turbidity changes of birch tree sap after addition of commonly available chemicals", *Biotechnol. Food Sci.*, 80 (2018b) 83-90.

<http://www.bfs.p.lodz.pl/index.php?pid=29&year=2016&journal=23&article=111>

Boroduskis, M., Kaktina, E., Blake, I., Nakurte, I., Dzabijeve, D., Kusina, I., Micule, S., Ramata-Stunda, A., "Chemical characterization and *in vitro* evaluation of birch sap and a complex of plant extracts for potential use in cosmetic anti-ageing products", *Environ. Exp. Biol.*, 15 (2017) 29-36. DOI: 10.22364/eeb.15.05

Carpintero, M., Marcet, I., Zorzanova, M., Rendueles, M., Diaz, M., "Effect of birch sap as solvent and source of bioactive compounds in casein and gelatin films", *Membranes*, 13 (2023) 786.

<https://doi.org/10.3390/membranes13090786>

Charkiewicz, A., Omeljaniuk, W.J., Nowak, K., Garley, M., Niklinski, J., "Cadmium toxicity and health effects – a brief summary", *Molecules*, 28 (2023) 6620. <https://doi.org/10.3390/molecules28186620>

Collin, M.S., Venkatraman, S.K., Vijayyakumar, N., Kanimozhi, V., Arbaaz, S.M., Stacey, R.G.S., Anusha, J., Choudhary, R., Lvov, V., Tovar, G.I., Senatov, F., Koppala, S., Swamiappan, S., "Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects on human: review", *J. Hazard. Mater. Adv.*, 7 (2022) 100094.

<https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100094>

Combes, D., Monsan, P., Matlouthi, M., "Enzymic hydrolysis of sucrose", *Carbohydrate Research*, 93 (1981) 312-316. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80864-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80864-2)

DiNicolantonio, J.J., O'Keefe, J.H., "Myo-inositol for insulin resistance, metabolic syndrome, polycystic ovary syndrome and gestational diabetes", *Open Hearth*, 9 (2022) e001989. DOI: 10.1136/openhrt-2022-001989

Dordevic, D., Capikova, J., Dordevic, S., Trelova, B., Gajdacs, M., Kushkevych, I., "Sulfur content in foods and beverages and its role in human and animal metabolism: a scoping review of recent studies", *Heliyon*, 9 (2023) e15452. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15452>

dos Santos, R., Vergauwen, R., Pacolet, P., Lescrinier, E., Van de Ende, W., "Manninotriose is a major carbohydrate in red deadnettle (*Lamium purpureum*, Laminiaceae)", *Ann. Bot.*, 111 (1013) 385-393.

<https://doi.org/10.1093/aob/mcs288>

EFSA 2006, "Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals, Scientific Committee on Food, Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies", EFSA, 2006

https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/ndatolerableuil.pdf

EFSA 2017, "EFSA explains risk assessment: nitrates and nitrites added to food", 2017.

https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/nitrates-nitrites-170614.pdf

EFSA 2020, "Update of the risk assessment of nickel in food and drinking water", EFSA 2020.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6268>

El Khadem, H.S., "Carbohydrates" in Meyers, R.A. (ed.), *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 3. painos, Elsevier Science Ltd., 2003.

EU 2020, "EU Direktiivi 2020/2184 ihmisten käyttöön tarkoitettun veden laadusta (uudelleenlaadittu)".

<https://eur-lex.europa.eu/eli/legal-content/summary/drinking-water-essential-quality-standards.html>

Euromixers, 2024. <https://www.euromixers.fi/ominaispaino/>.

FDA 2024, "Lead in food and foodwares", U.S. Food & Drug Administration, 2024.

<https://www.fda.gov/food/environmental-contaminants-food/lead-food-and-foodwares>

Gan, R-Y., Chan, C-L., Yang, Q-Q., Li, H-B., Zhang, D., Ge, Y-Y., Guantre, A., Ge, J., Corke, H., "9 _ Bioactive compounds and beneficial function of sprouted grains", in Feng, H. Nemzer B., DeVries, W. (eds)., "Sprouted Grains: Nutritional Value and Applications", AACC International, Elsevier inc., (2019) 191-246.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811525-1.00009-9>

Gennchi, G., Carrocci, A., Lauria, G., Sinicropi, S., Catalano, A., "Nickel: human health and environmental toxicology", *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17 (2020) 679. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17030679>

Grabek-Lejko, D., Kasprzyk, I., Zagula, G., Puchalski, C., "The bioactive and mineral compounds in birch sap collected in different types of habitats", *Baltic Forestry*, 23 (2017) 394-401.

https://balticforestry.lammc.lt/bf/PDF_Articles/2017-23%5B2%5D/Baltic%20Forestry%202017.2_394-401.pdf

Günther, A., Makuch, E., Nowak, A., Duchnik, W., Kucharski, L., Pelech, R., Klimowicz, A., "Enhancement of the antioxidant and skin permeation properties of botulin and its derivatives", *Molecules*, 26 (2021) 3435.

<https://doi.org/10.3390/molecules26113435>

Hayes, M., "Measuring protein content in food: an overview of methods", *Foods*, 9 (2020) 1340.

<http://dx.doi.org/10.3390/foods9101340>

Hewlings, S., Kalman, D., "Sulfur in human health", *EC Nutrition*, 14 (2019) 785-791.

<https://ecronicon.net/assets/ecnu/pdf/ECNU-14-00660.pdf>

Jeong, S.J., Lee, C.H., Kim, H.Y., Lee, S.H., Hwang, I.G., Shin, C.S., Lee, J. and Jeong, H.S., "Quality characteristics of the white birch sap with varying collection periods", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 1 (2012) 143-148. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.1.143>

Jeong, S.J., Jeong, H.S., Woo, S.H., Shin, C.H., "Consequences of ultrafiltration and ultraviolet on the quality of white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) sap during storage", *Aust. J. Crop Sci.*, 7 (2013) 1072-1077.

Jiang, H., Sakamoto, Y., Tamai, Y., Terazawa, M., "Proteins in the exudation sap from birch trees, *Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica* Hara and *Betula verrucosa* Her." *Eurasian J. For. Res.*, 2 (2001) 59-64.

<http://hdl.handle.net/2115/22131>

Kallio, H., Ahtonen, S., Raulo, J., Linko, R.R., "Identification of the sugars and acids in birch sap: [about acids and sugars]", *J. Food Sci.*, 50 (1985), 266-269. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13328.x>

Kallio, H., Ahtonen, S., "Seasonal variations of the acids in birch sap: [acids in birch sap]", *Food Chem.*, 25 (1987a), 285-292. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90015-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90015-X)

Kallio, H., Ahtonen, S., "Seasonal variations of the sugars in birch sap: [sugars in birch sap]", *Food Chem.*, 25 (1987b), 293-304. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90016-1)

Kallio, H., Rine, S., Pangborn, R.-M., Jennings, W., "Effect of heating on the headspace volatiles of Finnish birch syrup.", *Food Chem.*, 24 (1987c) 287-299. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90104-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90104-X)

Kallio, H., Lahdenoja, M.L., Penttinen, R., "Electrophoretic profiles of birch sap proteins of *Betula pubescens*, *B. pendula* and *B. pendula forma carelica* in Finland with reference to overall composition of sap." *The 1st International Symposium on Sap Utilization (ISSU) in Bifuka*. Vol. 95. 1995.

Kallio, H., "Composition and properties of birch sap and syrup", Non-Wood Forest Products Health and Wellbeing symposium 12.-13.11.2013.

Kuka, M., Cakste, I., Gersebeka, E., "Determination of bioactive compounds and mineral substances in Latvian birch and maple saps", *Proceedings of Latvian Academy of Sciences, Section B*, 67 (2013) 437-441.

DOI: [10.2478/prolas-2013-0069](https://doi.org/10.2478/prolas-2013-0069)

Kurttila, M.J., "A model for the sap yield of birches tapped by citizen scientist", *Silva Fennica*, 56 (2022) id10679. <https://doi.org/10.14214/sf.10679>

Lattanzio, V., "Phenolic compounds: Introduction", in Ramawat, K., Merillon, J.M. (eds), *Natural Products*, Springer, Berlin, Heidelberg, (2013) 1543-1580. https://doi.org/10.1007/978-3-642_22144-6_57

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819524516?via%3Dihub>

Luczaj, L., Bilek, M., Stawarczyk, K., "Sugar content in the sap of birches, hornbeams and maples in south eastern Poland", *Cent. Eur. J. Biol.*, 9 (2014) 410-416. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0284-8>

- Miina, J., Kurttila, M., "A model for the sap yield of birches tapped by citizen scientist", *Silva Fennica*, 56 (2022) 10679. <https://doi.org/10.14214/sf.10679>
- Mingaila, J., Ciuldiene, D., Viskelis, P., Bartkevicius, E., Vilimas, V., Armolaitis, K., "The quantity and biochemical composition of sap collected from silver birch (*Betula pendula* Roth) trees growing in different soils", *Forest*, 11 (2020) 365. <https://doi.org/10.3390/f11040365>
- Munteanu, I.G., Apetrei, C., "Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review", *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (2021) 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Ngueyen, T-H., Haltrich, D., "Microbial production of prebiotic oligosaccharides", in McNeil, B., Archer, D., Giavasis, I., Harvey, L. (eds.), *Microbial Production of Food Intermediates, Enzymes and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing, 2013.
- NIH 2021, "Manganese, fact sheet for health professionals", National Institutes of Health, 2021. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Manganese-HealthProfessional/>
- NIH 2022a, "Zinc, fact sheet for health professionals", National Institutes of Health, 2022. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>
- NIH 2022b, "Copper, fact sheet for health professionals", National Institutes of Health, 2022. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Copper-HealthProfessional/>
- NIH 2022c, "Chromium, fact sheet for health professionals", National Institutes of Health, 2022. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Chromium-HealthProfessional/>
- NIH 2023a, "Iron, fact sheet for health professionals", National Institutes of Health, 2023. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-Consumer/>
- NIH 2023b, "Phosphorus, fact sheet for health professionals", National Institutes of Health, 2023. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Phosphorus-HealthProfessional/>
- NIH 2024, "Selenium, fact sheet for health professionals", National Institutes of Health, 2024. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/>
- Nikolajeva, V., Zommere, Z., "Changes of physicochemical properties and predominant microbiota during storage of birch sap", *Int. Food Res. J.*, 25 (2018) 527-533.
- Nordic Koivu, 2024. <https://nordickoivu.com/en/news-blog/description-composition-and-intended-use-of-birch-sap>
- Ozolincius, R., Bareika, V., Rubiensiene, M., Viskelis, P., Mazeika, R., Staugaitis, G., "Chemical composition of silver birch (*Betula pendula* Roth.) and downy birch (*Betula pubescens* Her.) Sap", *Baltic Forestry*, 22 (2016) 222-229.
- Paulikiene, S., Mingaila, J., Vilimas, V., Bartkevicius, E., Viskelis, P., Raila, A., "Influence of ozone on the biochemical composition of birch sap", *Appl. Sci.*, 11 (2021) 2965. <https://doi.org/10.3390/app11072965>
- Peck, W.H., Cummings, E.E., van Slyke, E., "Carbon isotope composition of birch syrup", *J. Food Compos. Anal.*, 71 (2018) 25-27. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.012>
- Pätzold, R., Brükner, H., "Mass spectrometric detection and formation of D-aminoacids in processed plant saps, syrups and fruit juice concentrates", *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 9722-9729. DOI: 10.1021/jf051433u
- Roberts, B.R., Doecke, J.D., Rembach, A., Yevenes, L.F., Fowler, C.J., McLean, C.A., Lind, M., Volitakis, I., Masters, C.L., Bush, A.I., Hare, D.J., "Rubidium and potassium levels are altered in Alzheimers's disease brain and blood but not in cerebrospinal fluid", *Acta Neuropathol. Commun.*, 4 (2016) 119. DOI [10.1186/s40478-016-0390-8](https://doi.org/10.1186/s40478-016-0390-8)
- Ruokavirasto 2014, "Suomalaiset ravitsemussuosituksset 2014", https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/teemat/terveytta-edistava-ruokavalio/kuluttaja-jamattilaismateriaali/julkaisut/ravitsemussuosituksset_2014_fi_web_versio_5.pdf

- Ruokavirasto 2019, "Lasten ja aikuisten altistuminen nitraatille ja nitriitille", 2019. <https://www.ruokavirasto.fi/teemat/riskinarviointi/riskinarvioinnin-projektit/kemiallinen-elintarviketurvallisuus/lasten-ja-aikuisten-altistuminen-nitraatille-ja-nitriitille/>
- Ruokavirasto 2020, "Riskinarviointi suomalaisten aikuisten altistumisesta elintarvikkeiden ja talousveden raskasmetalleille sekä alumiinille" Ruokaviraston tutkimuksia 1/2020. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoameista/julkaisut/julkaisusarjat/tutkimukset/riskiraportit/ruokaviraston_tutkimuksia_1_2020_finaali.pdf
- Sancho, A.I., Birk, T., Gregsen, J.M., Rønne, Hornlet, S.E., Madsen, A.M., Bögh, K.I., "Microbial safety and protein composition of birch sap", *J. Food Compos. Anal.*, 107 (2022) 104347. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104347>
- Sauter, J.J., van Cleve, B., "Seasonal variation of aminoacids in the xylem sap of "Populus x canadensis" and its relation to protein body mobilization", *Trees*, 7 (1992) 26-32. <https://doi.org/10.1007/BF00225228>
- Schwab, U., "Raudanpuute ja ravitsemus", *Duodecim*, dlk01287, Kustannus Oy Duodecim, 2023. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01287>
- Schwab, U., "Kivennäisaineet", *Duodecim*, dlk01309 (032.000), Kustannus Oy Duodecim, 2024. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01309>
- Semjonovs, P., Denina, I., Fomina, A., Patetko, A., Auzina, L., Uptide, D., Uptis, A., Danilevics, A., "Development of birch (*Betula pendula* Roth.) sap based probiotic fermented beverage", *Int. Food Res. J.*, 21 (2014) 1763-1767.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic and phosphotungstic acid reagents", *Am. J. Enol. Vitic.*, 16 (1965) 144-158.
- Sousa, J.L.C., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Silva, A.M.S., "Recent developments in the functionalization of betulinic acid and its natural analogues: a route to new bioactive compounds", *Molecules*, 24 (2019) 355. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24020355>
- Staniszewski, P., Bilek, M., Szwer, W., Tomusiak, R., Osiak, P., Kocjan, R., Moskali, T., "The effect of tree age, daily sap volume and date of sap collection on the content of minerals and heavy metals in silver birch (*Betula pendula* Roth) tree sap", *PLoS ONE*, 15 (2020) e0244435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244435>
- STM 2023, "Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista annetun sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen muuttamisesta" <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2023/20230002>
- Strohm D, Bechthold A, Ellinger S, Leschik-Bonnet E, Stehle P, Hesecker H, "Revised Reference Values for the Intake of Sodium and Chloride", *Ann. Nutr. Metab.*, 72 (2018) 12-17. doi: 10.1159/000484355.
- Svanberg, I., Soukand, R., Luczaj, L., Kalle, R., Zyryanova, O., Denes, A., Papp, N., Nedelcheva, A., Seskauskaite, D., Kolodziejska-Degorska, I., Kolosova, V., "Uses of tree saps in northern and eastern parts of Europe", *Acta Soc. Bot. Pol.*, 81 (2012) 343-357. <http://dx.doi.org/10.5586/asbp.2012.036>
- THL 2024, "Mangaani", <https://thl.fi/aiheet/ymparistoverveys/vesi/kaivovesi/kaivoveden-kemiallinen-laatu/kaivovedessa-luonnostaan-esiintyvät-kemialliset-aineet/mangaani>, luettu 13.8.2024.
- Verma nee Juneja, S., Prakash, S., "Electrophoretic study of chromium speciation in xylem sap of maize (Winter Crop)", *Chemical Speciation & Bioavailability*, 20 (2008) 55-63. <https://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.3184/095422908X299920>
- Vincevica-Gaile, Z. 2014; "Impact of environmental conditions on micro- and macroelement content in selected food from Latvia", University of Latvia, Rīga. (2024) 179 pp.
- WHO 2023; "Lead poisoning", World Health Organization, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>
- Zambelli, B., Uversky, V.N., Ciurli, S., "Nickel impact on human health: an intrinsic disorder perspective", *Biochim. Biophys. Acta*, 1864 (2016) 1714-1731. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.09.008>

9. Liitteet

Liite 1. Luettelo koivumahlasta LC-MS/MS-menetelmällä tunnistetuista proteiineista (Sancho *et al.* 2022)

Table 4
List of identified proteins in birch sap harvested from one tree on day 7 of the 2018 tapping season by LC-MS/MS and *in silico* analyses.

Protein name	Organism	Accession number	Coverage (%)	Peptides No.	Unique Peptides No.	Length (calc.) (aa)	MW (calc.) (kDa)	pI (calc.)	PEP Score	Score Sequest HT	Function
Beta-galactosidase	<i>Betula platyphylla</i>	A0A4D6C821	44	22	22	836	92.0	6.90	109.58	171.47	CWM
Germin-like protein 1 (Fragment)	<i>Betula pendula</i>	P85336	100	1	1	13	1.3	9.99	2.49	7.11	PD
Germin-like protein 2 (Fragment)	<i>Betula pendula</i>	P85352	100	1	1	14	1.6	4.50	5.07	8.41	PD
Glutathione reductase	<i>Betula pendula</i>	Q9M3T6	15	3	3	358	38.9	6.34	6.59	9.50	OS
Pectin lyase-like protein	<i>Betula platyphylla</i>	A0A5B9FYX5	7	2	2	513	54.6	6.62	4.22	4.69	CWM
Peroxidase	<i>Betula platyphylla</i>	A0A0H4CPS8	64	20	20	321	34.8	5.57	101.94	210.23	OS
Peroxidase	<i>Betula platyphylla</i>	A0A0H4CNW3	68	19	14	318	33.5	6.77	90.94	223.71	OS
Peroxidase	<i>Betula platyphylla</i>	A0A0H4CNW8	52	12	12	272	29.7	6.35	58.14	123.22	OS
Peroxidase	<i>Betula platyphylla</i>	A0A0H4CRM9	47	10	7	322	33.8	8.24	50.16	100.64	OS
Peroxidase	<i>Betula platyphylla</i>	A0A0H4CRM3	23	7	2	569	59.8	5.08	24.61	89.01	OS
Peroxidase	<i>Betula platyphylla</i>	A0A0U2TQ78	21	4	4	315	3.4	6.40	10.08	22.86	OS
Peroxidase	<i>Betula platyphylla</i>	A0A0H4CVY2	3	1	1	326	35.6	8.41	1.17	2.40	OS
Peroxidase 3 (Fragment)	<i>Betula pendula</i>	P85334	100	1	1	19	2.2	4.50	7.71	16.20	OS
Polcalcic	<i>Betula pendula</i>	Q39419	36	3	3	85	9.4	4.94			CB
PR protein	<i>Betula pendula</i>	P43176	21	1	1	160	17.5	5.87			PD
PR protein 1 (Fragment)	<i>Betula pendula</i>	Q9M4Y4	11	1	1	102	10.8	6.51	4.21	7.74	PD
PR protein 1 (Fragment)	<i>Betula pendula</i>	Q9M3T1	56	1	1	57	6.0	5.17	3.25	3.99	PD
PR protein 1	<i>Betula platyphylla</i>	A0A4D6C8J9	6	1	1	176	19.3	8.65	1.43	1.77	PD
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<i>Betula platyphylla</i>	A0A0H4CPR2	29	3	3	220	22.5	6.65	10.11	13.36	OS
Superoxide dismutase 1	<i>Betula platyphylla</i>	A0A0H4CNV4	17	2	2	157	15.9	6.51	5.93	16.05	OS

PR: Pathogenesis-related; CWM: cell wall metabolism; CB: calcium binding; OS: oxidative stress; PD: pathogen defence. No.: number.