

**RYPSIN, HÄRKÄPAVUN JA *SPIRULINA PLATENSIS*-MIKROLEVÄN  
VAIKUTUKSET LYPSYLEHMIEN VALKUAISEN HYVÄSIKÄYTTÖÖN**

Essi Tarsia  
Maisterintutkielma  
Helsingin yliopisto  
Maataloustieteiden laitos  
Kotieläinten ravitsemustiede  
Kesäkuu 2016

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution – Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Essi Tarsia			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Rypsin, härkäpavun ja <i>Spirulina platensis</i> -mikrolevän vaikutukset lypsylehmien valkuaisen hyväksikäyttöön			
Oppiaine / Läroämne – Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma		Aika/Datum – Month and year Kesäkuu 2016	
		Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 60 s.	
Tiivistelmä/Referat – Abstract Eurooppaan tuodaan runsaasti valkuaisrehuja muista maanosista, ja Suomessakin käytetyistä valkuaisrehuista viime vuosina korkeintaan vain 25 % on ollut kotimaassa tuotettuja. Tuontivalkuaiselle on etsitty vaihtoehtoja kotimaisista palkoviljoista sekä yksisoluvalkuaisesta. Tämän maisterintutkielman tavoitteena oli tutkia härkäpapua ( <i>Vicia faba</i> ) ja <i>Spirulina</i> -mikrolevää ( <i>Spirulina platensis</i> ) lypsylehmien valkuaisenlähteenä seosrehuruokinnassa. Tutkimus oli kaksinkertainen 4 x 4 latinalainen neliö, jossa oli neljä ruokintaa ja neljä kolmen viikon jaksoa. Koeasetelma oli 2 x 2 faktoriaalinen, eli kokeessa verrattiin valkuaisen lähteenä rypsirohetta jauhettuun härkäpavun siemeneen sekä rypsin ja härkäpavun valkuaisen osittaista korvaamista (puolet) <i>Spirulina</i> -levän valkuaisella. Kaikki valkuaisrehuruokinnat olivat isonitrogeenisia. Tutkimuksessa tarkasteltiin ruokintojen vaikutusta kuiva-aiheen syöntiin, maitotuotokseen ja maidon koostumukseen, pötsin mikrobivalkuaisen tuotantoon, plasman aminohappoihin ja maitorauhasen aminohappojen ottoon sekä typen hyväksikäyttöön. Tutkimus tehtiin Viikin opetus- ja tutkimustilalla 21.2.–15.5.2015. Kokeessa oli mukana kahdeksan useamman kerran poikinutta ayrshire-lehmää, joiden poikimisesta oli keskimäärin 113 päivää kokeen alkaessa. Lehmät jaettiin kahteen neliöön, joista toisen neliön lehmillä oli pötsifisteli. Seosrehuruokinnat sisälsivät hyvälaatuista nurmisäilörehua (55 % kuiva-aineesta (ka)), ohraa, melassileikettä, kivennäistä sekä joko rypsirehua (9,9 %), härkäpapua (12,2 %), rypsin ja levän seosta tai härkäpavun ja levän seosta niin, että seoksissa levä korvasi puolet rypsin tai härkäpavun raakavalkuaisesta. Lehmät saivat seosrehua vapaasti. Rypsin ja härkäpavun korvaaminen <i>Spirulina</i> -levällä vähensi seosrehun syöntiä 0,6 kg kuiva-ainetta/pv. Härkäpapuruokinnissa maitotuotos oli keskimäärin 1,4 kg pienempi rypsirookintoihin verrattuna. Myös rasva-, valkuais- ja laktoosituotokset olivat pienemmät härkäpapuruokinnissa kuin rypsirookinnissa. <i>Spirulina</i> -levän lisäys härkäpapuruokintaan lisäsi maito-, valkuais- ja laktoosituotosta verrattuna puhtaaseen härkäpapuruokintaan, mutta lisätynä rypsirookintaan se vähensi niitä. Maidon ureapitoisuus sekä pötsin ammoniakkipitoisuus olivat suuremmat härkäpapuruokinnissa kuin rypsirookinnissa. Lisäksi härkäpapuruokinnissa useiden välttämättömien aminohappojen pitoisuudet plasmassa sekä maitorauhasen metioniinin ja histidiinin otto olivat pienemmät kuin rypsirookinnissa. Härkäpavun valkuaisen osittainen korvaaminen <i>Spirulina</i> lla suurensi välttämättömien aminohappojen AV-erotusta sekä maitorauhasen välttämättömien aminohappojen ottoprosenttia plasmasta. Typpitaset olivat positiivisia kaikissa koeruokinnissa, eikä typen saannissa ollut eroja eri koeruokintojen välillä. Härkäpapuruokinnissa tyyppiä eritettiin vähemmän maitoon ja sontaan kuin rypsirookinnissa. Rypsin ja härkäpavun valkuaisen osittainen korvaaminen <i>Spirulina</i> -levällä lisäsi virtsaan erittyvän typen osuutta sekä pienensi typpitasetta. Tämän tutkimuksen perusteella rypsin korvaaminen täysin härkäpavulla vähentää maito- ja valkuaisuutosta viljaan ja nurmisäilörehuun pohjautuvassa ruokinnassa. <i>Spirulina</i> -levä yhdessä härkäpavun kanssa lisäsi maito- ja valkuaisuutosta verrattuna pelkkään härkäpavuun, mutta vähensi tuotoksia yhdessä rypsin kanssa. Härkäpavun valkuainen ja <i>Spirulina</i> valkuainen luultavasti täydensivät toisiaan. Mikrolevistä tarvitaan kuitenkin lisätutkimusta valkuaisrehuna suurilla annostasoilla, jolloin voidaan tutkia niiden vaikutusta syöntiin ja maitotuotokseen. Lisäksi mikrolevien valkuaisen pötsihajoavuutta ei tunneta.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Rypsirouhe, härkäpavu, mikrolevä, valkuaisrehu, lypsylehmä, tyyppi			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Maataloustieteiden laitos ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Tutkijat: Anni Halmemies-Beauchet-Filleau, Marjukka Lamminen, Tuomo Kokkonen, Aila Vanhatalo, Seija Jaakkola Työn ohjaajat: tutkijatohtori Anni Halmemies-Beauchet-Filleau, yliopistonlehtori Seija Jaakkola			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution– Department Department of Agricultural sciences	
Tekijä/Författare – Author Essi Tarsia			
Työn nimi / Arbetets titel – Title The Influence of Rapeseed Meal, Faba Bean and Micro Algae <i>Spirulina platensis</i> on Protein Utilization of Dairy Cows			
Oppiaine /Läroämne – Subject Animal nutrition			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis	Aika/Datum – Month and year June 2016	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 60 p.	
Tiivistelmä/Referat– Abstract <p>Lots of protein feeds are imported to Europe. In Finland at most 25 % of all protein feeds used are home-grown. Legumes and single-cell protein are of interest to replace imported protein feeds. The aim of this study was to explore faba bean (<i>Vicia faba</i>) and Spirulina-algae (<i>Spirulina platensis</i>) as protein source for dairy cows. The study design was replicated 4 x 4 Latin square with four diets and four periods of three weeks. The experiment was 2 x 2 factorial. Rapeseed meal and rolled faba bean were compared as protein sources. The partial replacement (half) of rapeseed meal and faba bean protein with Spirulina-algae was also investigated. All the protein supplements were isonitrogenous. In this study, effects of protein supplements on dry matter intake, milk yield and milk composition, production of microbial protein in the rumen, plasma amino acids and mammary uptake of amino acids and nitrogen partitioning were examined.</p> <p>This study was made at the research farm of the University of Helsinki in 21.2.–15.5.2015. There were eight multiparous Finnish ayrshire dairy cows at mid-lactation. The cows were divided in two blocks the other block having rumen fistulated animals. All the total mixed ratios contained grass silage of good quality, barley, sugar pulp and minerals supplemented with different protein sources. Cows were offered total mixed ratios ad libitum.</p> <p>Replacing rapeseed meal and faba bean with Spirulina-algae reduced dry matter intake. The milk yield was 1,4 kg/d greater on rapeseed meal diets compared with faba bean diets. Mixing Spirulina-algae with faba bean increased milk, protein and lactose yields, but when mixed with rapeseed meal decreased them. Both milk urea and rumen ammonia concentrations were higher in faba bean diets than in rapeseed meal diets. The concentration of several essential amino acids in plasma and mammary uptake of histidine and methionine were lower in faba bean diets than in rapeseed meal diets. Replacing faba bean partially with Spirulina increased AV-difference of essential amino acids. Nitrogen balances were positive in all experimental diets. There were no differences in nitrogen intake. Feeding faba beans reduced nitrogen secretion in milk and faeces compared to rapeseed meal diets. Replacing rapeseed meal and faba bean partially with Spirulina increased the proportion of nitrogen secreted in urine and lowered nitrogen balance.</p> <p>According to this study replacing rapeseed meal completely with faba bean seeds reduce milk and protein yields on diets based on grass silage and cereals. Mixing Spirulina with faba bean increased milk, protein and lactose yields, but decreased them when mixed with rapeseed meal. Protein of faba bean and Spirulina probably completed each others. More research is needed with high levels of micro algae on dry matter intake, animal performance and degradability of microalgal protein in rumen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Rapeseed meal, faba bean, micro algae, protein supplement, dairy cow, nitrogen			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information <p>Researchers: Anni Halmemies-Beauchet-Filleau, Marjukka Lamminen, Tuomo Kokkonen, Aila Vanhatalo, Seija Jaakkola</p> <p>Supervisors: postdoctoral researcher Anni Halmemies-Beauchet-Filleau, university lecturer Seija Jaakkola</p>			

# SISÄLLYS

LYHENTEET .....	5
1 JOHDANTO.....	6
2 LYPSELEHMIEN VALKUAISRUOKINTA.....	8
2.1 Härkäpapu valkuaisen lähteenä.....	8
2.2 Mikrolevät lypsylehmien valkuaisen lähteenä.....	11
2.3 Typen hyväksikäyttö maidontuotannossa.....	13
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEEESIT.....	15
4 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	16
4.1 Koeasetelma ja koe-eläimet.....	16
4.2 Rehut ja ruokinta .....	17
4.3 Maitotuotos ja maidon koostumus.....	19
4.4 Pötsifermentaatio .....	19
4.5 Sonta- ja virtsanäytteet.....	20
4.6 Verinäytteet .....	20
4.7 Näytteiden analysointi.....	21
4.8 Tulosten laskenta ja tilastollinen analyysi.....	23
5 TULOKSET .....	25
5.1 Rehujen kemiallinen koostumus .....	25
5.2 Rehujen syönti ja ravintoaineiden saanti .....	25
5.3 Maitotuotos ja maidon koostumus.....	27
5.4 Plasman aminohapot sekä maitorauhasen aminohappometabolia .....	32
5.5 Typpitase ja typen jakautuminen .....	36
6 TULOSTEN TARKASTELU.....	38
6.1 Rehut ja syönti .....	38
6.2 Maitotuotos ja maidon koostumus.....	41
6.3 Plasman aminohapot sekä maitorauhasen aminohappometabolia .....	44
6.4 Typpitase ja typen jakautuminen .....	47
7 JOHTOPÄÄTÖKSET.....	50
KIITOKSET.....	51
LÄHTEET.....	52

## LYHENTEET

AIA	happoon liukenematon tuhka (engl. acid insoluble ash)
INDF	sulamaton NDF (engl. indigestible NDF)
ka	kuiva-aine (engl. dry matter)
NDF	neutraalidetergenttikuitu (engl. neutral detergent fibre)
NPN	ei proteiineistä peräisin oleva typpi (engl. non-protein nitrogen)
VFA	haihtuvat rasvahapot (engl. volatile fatty acids)

## 1 JOHDANTO

Maailman väestö lisääntyy ja lihansyönti yleistyy elintason noustessa. Samaan aikaan ilmastonmuutos sekä luonnonvarojen ja makean veden määrän ehtyminen aiheuttavat ongelmia ruoantuotannolle (Peltonen-Sainio ja Niemi 2012). Eurooppaan tuodaan runsaasti soijapapua (*Glycine max*) valkuaisrehuksi. Euroopassa käytettävästä soijasta vain 2 % on ollut Euroopassa viljeltyä. Suomeen tuodaan soijan lisäksi myös rypsiä (*Brassica rapa L. oleifera*) ja rapsia (*Brassica napus L. oleifera*). Suomessa käytetyistä valkuaisrehuista parhaimmillaan vain 25 % on ollut kotimaassa tuotettuja rehuja viime vuosina. Etenkin yksimahaiset ovat riippuvaisia tuontisoijasta (Peltonen-Sainio ym. 2013). Runsas valkuaisen tuonti heikentää huoltovarmuutta, ja asettaa meidät riippuvaisiksi valkuaisen saatavuudesta ja sen hinnasta. Tuontirehun mukana on myös aina suurempi tautiriski kuin Suomessa tuotetuissa rehuissa (Peltonen-Sainio ym. 2013). Soijan lisääntyvä viljely ei myöskään ole kestävää viljelyä, vaan se aiheuttaa metsien tuhoutumista Brasiliassa voimistaen ilmastonmuutosta (Sasu-Boakye ym. 2014). Suurin osa soijasta on geenimuunneltua, mikä arveluttaa kuluttajia (Volpelli ym. 2010).

Vaihtoehtoisina kotimaisina valkuaiskasveina voidaan viljellä palkoviljoja, kuten härkäpapua (*Vicia faba*) ja hernettä (*Pisum sativum*). Niitä voidaan käyttää kotimaisena valkuaisenlähteenä niin sialle ja siipikarjalle kuin märehitijöillekin. Joustavuutta ruokintaan tuo mahdollisuus käyttää palkoviljoja myös kokoviljasäilörehuna pohjoisemmassa Suomessa, jossa ne eivät ehdi tuleentua (Stoddard ym. 2009). Palkoviljoja viljelemällä voidaan saavuttaa niin viljelytekniisiä kuin taloudellisiakin etuja. Palkokasvit kykenevät biologiseen typensidontaan niiden juurinystyröissä elävien *Rhizobium*-bakteerien avulla. Tämä vähentää väkilannoitteiden käyttöä, monipuolistaa viljelykiertoa, vähentää pelkän viljan viljelyn tautipainetta ja parantaa maan fosforin liukoisuutta sekä maan rakennetta. Palkokasvien viljely on myös luomuviljelyn perusta (Stoddard ym. 2009, Köpke ym. 2010).

Viime vuosina on etsitty uusia valkuaisen lähteitä palkokasvien ohelle. Uusiksi varteenotettaviksi valkuaisenlähteiksi ovat nousemassa yksisoluiset proteiininlähteet eli mikrolevät, sienet, hiivat ja bakteerit (Becker 2007, McDonald ym. 2011). Mikrolevien tuottamaa biomassaa voidaan käyttää raaka-aineena biopolttoaineiden tuotannossa. Esimerkiksi mikrolevien sisältämä öljy voidaan erottaa biopolttoaineiden lähteeksi, ja käyttää jäljelle jäävä levämassa kotieläinten rehuna (Lum ym. 2013, Lunkka-Hytönen ym. 2013). Mikrolevät sisältävät runsaasti hyvälaatuista valkuaista, ja niitä voidaan kasvattaa ravintoliuoksessa avoimissa kasvatusaltaissa tai suljetuissa fotobioreaktoreissa. Näin ollen mikrolevät eivät kilpaile perinteisten viljelykasvien kanssa samasta peltopinta-alasta (Lunkka-Hytönen ym. 2013). Mikrolevät myös vaativat pienen pinta-alan perinteisiin viljelykasveihin verrattuna. Mikrolevien valkuaissto on ollut 4 000–15 000 kg hehtaaria kohden, kun taas härkäpavun valkuaissto on 1 000–2 000 kg/ha ja rypsin vain 750 kg/ha (Van Krimpen ym. 2013).

Ympäristöhallinnon verkkopalvelun mukaan vuonna 2014 Suomen typpipäästöistä 46,5 % oli maataloudesta peräisin olevia. Suomalaisten maitotilojen typpitaseiden on todettu olevan selkeästi ylijäämäisiä (Virtanen ja Nousiainen 2005). Lypsylehmien virtsan ja sonnan mukana ravintoaineiden ylimäärä kulkeutuu ympäristöön. Typpi on fosforin ohella yleensä rajoittava ravinne niin maa- kuin vesiekosysteemeissä (Antikainen ym. 2005). Typpi voi myös vapautua kaasumaisina yhdisteinä typen oksideina tai ammoniakkinä usein lannan varastoinnin ja levityksen yhteydessä. Dityppioksidi  $N_2O$  on ilmastomuutosta voimistava kasvihuonekaasu. Lisäksi typpi voi aiheuttaa maaperän happamoitumista (Antikainen ym. 2005, Paasonen-Kivekäs 2009).

## 2 LYPSYLEHMIEN VALKUAISSRUOKINTA

### 2.1 Härkäpapu valkuaisen lähteenä

Vuonna 2014 härkäpapua viljeltiin 8 700 hehtaarilla keskimääräisen satotason ollessa 2 460 kg/ha (Luonnonvarakeskus (Luke), tilastotietokanta, 2015). Rehu-  
taulukoiden (Luke 2015) mukaan härkäpapu sisältää raakavalkuaista 300 g/kg ka, kun taas rypsirouheen raakavalkuaispitoisuus on 379 g/kg ka. Härkäpapu sisältää vähemmän neutraalidetergenttikuitua (160 g/kg ka vs. 270 g/kg ka), mutta enemmän tärkkelystä (380 g/kg ka vs. 45 g/kg ka) kuin rypsirouhe. Suuren tärkkelyspitoisuuden takia härkäpapua voidaan pitää myös energiarehuna. Härkäpavun valkuaisessa on vain vähän rikkipitoisia aminohappoja kuten metioniinia, mutta runsaasti lysiniä (taulukko 1). Välttämättömistä aminohapoista metioniini ja lysini (Robinson 2010) sekä histidiini (Vanhatalo ym. 1999) ovat maidontuotantoa todennäköisesti ensimmäisenä rajoittavia aminohappoja. Muiden palkoviljojen tapaan härkäpavun pötsihajoavuus on rypsiä suurempi, sillä sen hajoavan valkuaisen osuus on 0,80, kun rypsirouheen hajoavan valkuaisen osuus on vain 0,63. Härkäpavun valkuaisesta suurin osa hajoaa siis jo pötsissä, ja pötsin ohittavan valkuaisen määrä on pieni. Erilaiset käsittelyt, kuten pelletöinti, extruder-käsittely tai kemialliset käsittelyt voivat vaikuttaa härkäpavun valkuaisen hajoavuuteen (Cros ym. 1991).

Härkäpapu, kuten muutkin palkokasvit, sisältää runsaasti kalsiumia (Luke 2015), mikä voi aiheuttaa kalsiumin liikasaantia kalsiumpitoisia kivennäisiä käytettäessä. Palkokasvien sisältämiä haitta-aineita eli sekundaarimetaboliitteja, kuten tanniniä, visiinia ja konvisiinia, on saatu jalostuksella vähennettyä (Stoddard ym. 2009). Erilaiset käsittelyt voivat vaikuttaa myös haitta-aineiden pitoisuuksiin. Haitta-aineet eivät märehelijöiden ruokinnassa juurikaan rajoita palkokasvien käyttöä pötsimetabolian takia, vaan ne muodostavat suuremman ongelman yksimahaisten ruokinnassa (Puhakka ym. 2012). Haitta-aineiden lisäksi palkokasvit sisältävät fytoestrogeneja, joilla on arveltu olevan negatiivisia vaikutuksia hedelmällisyyteen (Tufarelli ym. 2015). Toisaalta fytoestrogeneilla on arveltu olevan myös anti-



karsinogeenisiä vaikutuksia. Gattan ym. (2013) tutkimuksessa lihasioilla fytoestrogeenejä pidättyi enemmän lihakseen härkäpapuruokinnassa kuin soijaruokinnassa, ja tätä pidettiin mahdollisesti kuluttajille positiivisena asiana.

Taulukko 1. Soijarouheen, rypsirouheen, härkäpavun (Luke 2015) sekä *Spirulina*-mikrolevän (Becker 2007) välttämättömien aminohappojen pitoisuudet.

Välttämättömät aminohapot, g/kg rv	Soijarouhe	Rypsirouhe	Härkäpapu	<i>Spirulina platensis</i>
Arginiini	77	58	89	73
Fenyylialaniini	54	41	41	53
Histidiini	29	28	26	22
Isoleusiini	47	39	36	67
Leusiini	83	70	68	98
Lysiini	62	58	59	48
Metioniini	14	18	6	25
Treoniini	40	44	31	62
Tryptofaani	13	12	9	3
Valiini	49	49	41	71

Puhakka ym. (2014) vertasivat kahdessa kokeessa härkäpapua rypsirouheeseen. Ensimmäisessä kokeessa härkäpapu odotusten vastaisesti tuotti paremman maitotuotoksen kuin rypsirouhe ja lisäsi syöntiä rypsiin verrattuna. Kokeessa havaittiin myös positiivinen yhdysvaikutus härkäpavun ja rypsin välillä, sillä härkäpavun ja rypsin yhdistelmää syötettäessä havaittiin suurempi maitotuotos ja suuremmat valkuais-, rasva- ja laktoosituotokset kuin syötettäessä härkäpapua tai rypsirouhetta yksinään. Toisessa kokeessa tutkittiin myös härkäpapua, rypsirouhetta sekä niiden sekoitusta, kun käytössä oli kaksi eri valkuaisrehujen annostasoa. Korkea valkuaispitoisuus vastasi 3,5 kg rypsiä päivässä ja matala valkuaispitoisuus 1,5 kg rypsiä päivässä. Tämän kokeen tulokset olivat vastakkaiset verrattuna ensimmäiseen kokeeseen. Sekä matalan että korkean valkuaispitoisuuden ruokinnoissa kuiva-aineen syönti ja maitotuotos olivat suuremmat rypsirookinnassa kuin härkäpapuruokinnassa. Rypsi vaikutti myös maidon koostumukseen, sillä maidon valkuaispitoisuus sekä valkuais-, rasva- ja laktoosituotokset olivat suuremmat rypsirookinnassa kuin härkäpapuruokinnassa. Maidon ureapitoisuus oli suurempi härkäpapuruokinnassa

kuin rypsirookinnassa molemmissa valkuaisasoissa, mikä viittaa rypsiä saadun valkuaisen olevan paremmin lehmän hyödynnettävissä.

Perinteisen parmesaani-juuston valmistukseen ei ole haluttu Italiassa käyttää maitoa, jota tuottaville lehmille on syötetty geenimuunneltua soijaa. Italiassa onkin tutkittu härkäpapua vaihtoehtoisena valkuaislähteenä soijalle. Volpellin ym. (2010) kahdessa kokeessa lämpökäsitelty härkäpapu korvasi osittain soijaa. Molemmissa kokeissa kontrolliruokinnassa väkirehun soijan osuus oli 12 %, ja härkäpapuruokinnassa härkäpavun osuus väkirehussa oli 10 % ja soijan osuus 7,5 %. Kokeessa karkearehun syöntiä ei pystytty mittaamaan, mutta molempien kokeiden väkirehutasot olivat 7,6–7,9 kg/pv. Kokeet erosivat toisistaan siten, että ensimmäisessä kokeessa karkearehuna oli seos (tuorepainona tuore nurmi 50 %, kuiva heinä 35 %, sinimailanen 15 %), ja toisessa kokeessa pelkkä kuiva heinä. Kokeissa härkäpapu ei vaikuttanut negatiivisesti väkirehun syöntiin, maitotuotokseen tai maidon koostumukseen. Kokeen lehmät tosin olivat melko matalatuottoisia, sillä niiden maitotuotos oli keskimäärin 22 kg päivässä. Ensimmäisessä kokeessa maidon ureapitoisuus oli suuntaa-antavasti pienempi härkäpapuruokinnassa kuin soijaruokinnassa, ja toisessa kokeessa ero oli merkitsevä. Lisäksi toisessa kokeessa veren ureapitoisuus oli pienempi härkäpapuruokinnassa kuin soijaruokinnassa. Maidon ja veren ureapitoisuuksien perusteella ammoniakkin määrä pötsissä oli pienempi härkäpapuruokinnassa, mikä saattaa johtua lämpökäsitellyn härkäpavun pienemmästä pötsihajoavuudesta.

Tufarellin ym. (2012) kokeessa lypsykautensa alussa olleilla Holstein-lehmillä härkäpapu korvasi täysin soijan. Koe oli ensimmäisiä kokeita, joissa härkäpapu korvasi täysin soijaa ilman, että käytettiin valkuaisen lähteenä useiden palkokasvien seoksia (Mordenti ym. 2007, Volpelli ym. 2012). Tässä kokeessa väkirehuista valmistettiin pellettejä, jotka kontrolliruokinnassa sisälsivät 150 g/kg ka soijarouhetta ja härkäpapuruokinnassa härkäpapua 345 g/kg ka. Lisäksi kummatkin väkirehut sisälsivät auringonkukkarouhetta 75 g/kg ka valkuaisenlähteenä. Väkirehuokinnat olivat isonitrogeenisia ja väkirehujä annettiin lehmän maitotuotoksen

mukaan. Soijan korvaaminen härkävavulla ei vaikuttanut maitotuotokseen eikä maidon koostumukseen. Kuten Volpellin ym. (2010) kokeissa, myös tässä kokeessa maidon ureapitoisuus oli pienempi härkäpapuruokinnassa kuin kontrolliruokinnassa. Lisäksi veren ureapitoisuus oli pienempi härkäpapuruokinnassa kuin kontrolliruokinnassa.

## 2.2 Mikrolevät lypsylehmien valkuaisen lähteenä

Mikrolevät pystyvät yhteyttämään eli ne tuottavat hapetta ja glukoosia auringon energian ja hiilidioksidin avulla. Ravinteita mikrolevät pystyvät ottamaan esimerkiksi jätevesistä (Lunkka-Hytönen ym. 2013). Mikrolevät tuottavat jopa puolet maapallon yhteyttämässä syntyvästä hapesta. Mikrolevien tarkkaa lajimäärää ei tunneta, vaan niitä on arvioitu olevan jopa miljoona eri lajia, jotka ovat erittäin heterogeenisiä. Mikrolevät voivat olla joko aitotumallisia tai esitumallisia, ja niiden koostumus, muoto ja kasvuympäristö vaihtelevat (Singh ja Saxena 2005). *Spirulina platensis* -mikrolevä (tästä eteenpäin *Spirulina*) kuuluu syanobakteereihin. *Spirulina*-levä on muodoltaan spiraali ja se on pituudeltaan 0,5 mm (Becker 2007). *Spirulina* viihtyy parhaiten suolaisessa (>30 g/l), lämpimässä (35–39 °C) ja emäksisessä (pH 8,5–11) vedessä (Vo ym. 2015). *Spirulina*-levää tuotetaan noin 3 000 tn vuodessa pääosin Kiinassa, Intiassa ja Yhdysvalloissa (Kovač ym. 2013).

*Spirulina*-levä sisältää valkuaista 460–630 g/kg ka, hiilihydraatteja 80–140 g/kg ka ja lipidejä 40–90 g/kg ka. Suuresta raakavalkuaisen määrästä kuitenkin 11,5 % on ei-proteiinityppi – yhdisteitä eli NPN-yhdisteitä (Becker 2007). Lisäksi *Spirulina* sisältää A-, B-, C-, D- ja E-vitamiineja, kivennäisaineita sekä runsaasti karotenoideja (Holman ja Malau-Aduli 2012, Vo ym. 2015). *Spirulina* lipidit sisältävät runsaasti monitydyttymättömiä rasvahappoja (PUFA) linolihappoa (18:2n-6) ja gamma-linoleenihappoa (18:3n-6, GLA) sekä tyydyttynyttä palmitiinihappoa (16:0) (Vo ym. 2015). *Spirulina*-levän valkuainen sisältää kaikkia välttämättömiä aminohappoja, mutta sen histidiinipitoisuus on pienempi verrattuna rypsiin ja härkäpavuun (taulukko 1). Histidiinin on todettu olevan ensimmäinen maidontuotantoa rajoit-

tava aminohappo viljaan ja nurmisäilörehuun pohjautuvassa ruokinnassa (Vanhatalo ym. 1999). Spirulina-leväruokinnissa histidiinin saanti voi siis rajoittaa maitotuotosta ja vähentää maidon valkuaispitoisuutta. Spirulinan valkuainen sisältää kuitenkin runsaasti metioniinia rypsiin ja etenkin härkäpapuun verrattuna.

Mikrolevistä valkuaisrehuna on vain vähän tutkimustietoa. Spirulina-levää on tutkittu etenkin munivien kanojen, broilereiden sekä kalojen ruokinnassa (Becker 2007). Tähän mennessä märehitijöillä tehty mikrolevätutkimus on keskittynyt maidon rasvahappojen pitoisuuksien seurantaan (Boeckert ym. 2008, Lum ym. 2013). Mikrolevillä on ollut vaihtelevia vaikutuksia syöntiin ja maitotuotokseen. Boeckertin ym. (2008) kokeessa *Schizochytrium sp.* - mikrolevä vähensi syöntiä ja maitotuotosta, kun taas Kulpyksen ym. (2009) kokeessa Spirulina -mikrolevä lisäsi maitotuotosta kontrolliryhmään verrattuna. Aiemmissä kokeissa tosin levän syöntimäärät ovat olleet pieniä, joten levän vaikutus syöntiin ei välttämättä ole ollut kovin suuri. Levä voisi vähentää syöntiä levän huonon maittavuuden tai suuren monityydyttymättömien rasvahappojen määrän takia (Drewery 2012, Halmemies-Beauchet-Filleau ym. 2016). Pitkät monityydyttymättömät rasvahapot ovat myrkyllisiä kuitua sulattaville pötsimikrobeille (McDonald ym. 2011).

Kulpys ym. (2009) tutkivat Spirulina-levän vaikutusta maidontuotantoon. Liettualaiset maatiaislehmät olivat lypsykautensa alkuvaiheessa. Sekä kontrolliryhmän että Spirulina-ryhmän ruokinnat olivat muuten samanlaiset, mutta Spirulina-ryhmän lehmien väkirehuun lisättiin Spirulina-levää 200 g ka/pv. Kokeessa maitotuotos lisääntyi mikroleväruokinnassa kontrolliruokintaan verrattuna. Maidon rasva- ja valkuaispitoisuuksiin Spirulina-levällä ei tässä kokeessa ollut vaikutusta, mutta rasva- ja valkuaisruokinnat olivat kontrolliryhmää suuremmat paremman maitotuotoksen takia. Ylisen (2015) kokeessa rypsirouhetta korvattiin Spirulina- ja *Chlorella (Chlorella vulgaris)*-mikrolevien seoksella (1:1). Valkuaisruokinnat olivat isonitrogenisiä siten, että kontrolliruokintana oli rypsirouhe (2,3 kg/pv), toisena ruokintana rypsin (1,2 kg/pv) ja leväjauheiden (0,5 kg/pv) seos ja kolmantena ruokintana pelkkä leväjauho (1,0 kg/pv). Rypsin korvaaminen levällä ei tässä

kokeessa vaikuttanut kuiva-aineen syöntiin, maitotuotokseen tai maidon pitoisuuksiin. Mikroleväruokinnassa plasman histidiinipitoisuus oli rypsiuokintaa pienempi, mutta maidon valkuaispitoisuuksiin tai -tuotokseen tämä ei vaikuttanut. Kokeessa rypsin osittainen korvaaminen mikroleväseoksella antoi suuntaantavasti suurimman maitotuotosvasteen. Kokeen lehmät olivat kuitenkin matalan tuotostason vaiheessa loppulypsykaudella. Näin ollen matala tuotostaso on voinut tasoittaa rypsin ja leväjauheiden välisiä tuotoseroja.

### **2.3 Typen hyväksikäyttö maidontuotannossa**

McDonaldin ym. (2011) mukaan nauta tarvitsee aminohappoja etenkin maidontuotantoon. Aminohappoja tarvitaan lisäksi sikiön kasvuun tiineyden ajan, eläimen omaan ylläpitoon ja kasvuun sekä epiteelikudoksen uudistumiseen. Märehtijät saavat valkuaista ohitusvalkuaisesta, mikrobivalkuaisesta ja endogeenisestä valkuaisesta. Mikrobivalkuainen, jonka pötsimikrobit syntetisoivat pötsissä ravinnon aminohapoista tai ammoniakista, on tärkeä valkuaisen lähde. Syntyvän mikrobivalkuaisen määrään vaikuttaa pötsissä vapautuvan energian ja valkuaisen suhde. Valkuaisen hydrolyysissä pötsissä hajoava valkuainen hajoaa ensin peptideiksi ja edelleen aminohapoiksi, jotka ovat mikrobien valkuaisssynteesin lähtöaineita. Peptidien hajoaminen aminohapoiksi voi olla valkuaisen hajoamista rajoittava vaihe.

McDonaldin ym. (2011) mukaan pötsissä hajoavan ja hajoamattoman valkuaisen lisäksi pötsiin tulee rehun mukana typpeä NPN-yhdisteiden eli esimerkiksi amiini- ja amidien muodossa. NPN-yhdisteet muuttuvat pötsissä ammoniakiksi, ja siitä edelleen joko mikrobivalkuaiseksi tai ammoniakki siirtyy verenkierron mukana maksaan. Jos nauta saa ravinnosta enemmän NPN-yhdisteitä ja hajoavaa valkuaista kuin mikrobivalkuaista muodostuu, lisääntyy pötsinesteen ammoniakin määrä. Mikrobivalkuaisen muodostumista voi rajoittaa myös pötsimikrobien energian puute. Tällöin ylimääräinen pötsissä hajonnut valkuainen sekä NPN-yhdisteet muutetaan ammoniakiksi, joka kulkeutuu verenkierron mukana maksaan. Maksa muuttaa ammoniakin ureaksi, joka eritetään munuaisten kautta virtsan mukana.

Jos ravinnossa on vain vähän valkuaista, voi urea diffusoitua verestä sylkeen tai palautua pötsiin suoraan verenkierron mukana, jolloin urea hajoaa pötsissä ammoniakiksi ja hiilidioksidiksi. Paasonen-Kivekkään (2009) mukaan sonnan ja virtsan typpi eritetään ureana, jonka ureaasi-entsyymi muuttaa ammoniakiksi ( $\text{NH}_3^-$ ), joka hapettuu edelleen ammonium-ioniksi ( $\text{NH}_4^+$ ). Nitrifikaatiossa maaperän mikrobit hapettavat ammoniumin nitriitiksi ja edelleen nitraatiksi ( $\text{NO}_3^-$ ). Nitraattityppi on helppoliukoista, ja näin ollen huuhtoutuu helposti vesistöihin. Nitriitin hapettuessa nitraatiksi vapautuu samalla vety-atomi ( $\text{H}^+$ ), joka happamoittaa maaperää. Hapettomissa olosuhteissa voi myös tapahtua denitrifikaatiota, jossa syntyy dityppioksidia ( $\text{N}_2\text{O}$ ) tai typpikaasua ( $\text{N}_2$ ). Typen oksidit ovat voimakkaita kasvihuonekaasuja.

Lypsylehmien valkuaisruokinnan kannalta on tärkeää tietää rehun raakavalkuaispitoisuuden lisäksi rehun pötsissä hajoavan valkuaisen osuus. Pötsin ohittava valkuainen kulkeutuu ohutsuoleen, jolloin rehun valkuaisarvoon vaikuttavat myös valkuaisen ohutsuolisulavuus ja aminohappokoostumus. Aminohappokoostumuksen tietäminen on sen takia tärkeää, että tarpeen ylittävät aminohapot eritetään virtsaan ureana. Kotimaisessa vertailussa typen hyväksikäyttö huononi 0,53 %, kun väkirehun raakavalkuaispitoisuus lisääntyi 1,0 % (Nousiainen ym. 2003). Toisaalta valkuaislisä lisää maitotuotosta, ja esimerkiksi rypsin on todettu lisäävän maitotuotosta lineaarisesti, kun annostasot olivat 0, 1, 2 ja 3 kg rypsiä päivässä (Rinne ym. 1999). Kuitenkin valkuaisrehut ovat yleensä kotieläinten ruokinnassa kalleimpia rehuja. Näin ollen lypsylehmän valkuaisruokintaan vaikuttavat ympäristötekijöiden lisäksi taloudelliset tekijät eli valkuaislisän hinta verrattuna siitä saatavaan hyötyyn eli maidon hintaan.

### 3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEESIT

Tämä tutkimus oli osana MAKERA:n ja Raisioagro Oy:n rahoittamaa Kestävä tehokkuus -hanketta, jossa tavoitteena oli vähentää fossiilisten polttoaineiden kulu- tusta sekä vähentää maatalouden aiheuttamia ympäristövaikutuksia. Fossiilisten polttoaineiden kulutusta voitaisiin vähentää hyödyntämällä viljelyssä palkokasve- ja, jolloin typpilannoituksen tarve vähenee. Palkokasvien käyttö lypsylehmien ruo- kinnassa puolestaan vähentää tuontisoijan tarvetta ja parantaa valkuaisomavarai- suutta.

Tutkimuksen tavoitteena oli verrata härkäpapua ja rypsirouhetta lypsylehmien valkuaisen lähteenä. Lisäksi selvitettiin, voitaisiinko härkäpavun ja rypsin valku- aista korvata osittain Spirulina-levän valkuaisella. Tässä maisterintutkielmassa keskitytään valkuaisen hyväksikäyttöön. Tutkimuksesta saadut muut tulokset käsi- tellään toisessa tutkielmassa.

Tutkimuksen hypoteesina oli, että rypsirouhkan korvaaminen härkäpavulla vähen- tää maitotuotosta härkäpavun valkuaisen suuremman pötsihajoavuuden sekä pie- nemmän metioniinipitoisuuden takia. Toisena hypoteesina oli, että edellä maini- tuista syistä johtuen härkäpapu myös heikentää valkuaisen hyväksikäyttöä mai- dontuotantoon. Kolmantena hypoteesina oli, että rypsin ja härkäpavun valkuaisen korvaaminen puoliksi Spirulina-levän valkuaisella vähentää kuiva-aineen syöntiä Spirulinan huonomman maittavuuden vuoksi. Neljäntenä hypoteesina oli, että mai- to- ja valkuaisuutos ovat pienemmät, kun rypsin ja härkäpavun valkuaisesta kor- vataan puolet Spirulinan valkuaisella. Tämä johtuisi Spirulinan valkuaisen pie- nemmästä histidiinipitoisuudesta. Viidentenä hypoteesinä oli, että Spirulinan val- kuaisen suurempi metioniinipitoisuus täydentää härkäpavun aminohappokoostu- musta lypsylehmien ruokinnoissa.

## 4 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 4.1 Koeasetelma ja koe-eläimet

Tutkimus tehtiin Viikin opetus- ja tutkimustilalla 21.2.2015–15.5.2015. Ruokinta-koe oli kaksinkertainen 4 x 4 latinalainen neliö, joka koostui neljästä kolmen viikon jaksosta. Jakson kaksi ensimmäistä viikkoa (päivät 1–14) olivat totutusviikkoja, ja jakson kolmas viikko (päivät 15–21) oli keruuviikko. Koejakso vaihtui aina lauantaiamuisin rehukuppien tyhjennyksen jälkeen. Kokeessa oli kahdeksan ayrshire-rotuista lypsylehmää, jotka jaettiin kahteen neliöön (taulukko 2). Toisen neliön lehmillä oli pötsifisteli.

Taulukko 2. Lehmien jakautuminen eri koeruokinnolle<sup>1</sup> jaksoittain.

Lehmä:	Neliö 1				Neliö 2 (pötsifistelit)			
	Enya	Hösselix	Iconessa	Ilopilleri	Avenue	Ahaa	Yabonita	Ässämix
Jakso:								
I 21.2.-13.3.15	1	2	3	4	1	2	3	4
II 14.3.-3.4.15	2	3	4	1	4	1	2	3
III 4.4.-24.4.15	4	1	2	3	2	3	4	1
IV 25.4.-15.5.15	3	4	1	2	3	4	1	2

<sup>1</sup> Koeruokinnat:

- 1 = Rypsi
- 2 = Rypsi + Spirulina-levä
- 3 = Härkäpapu
- 4 = Härkäpapu + Spirulina-levä

Lehmät olivat poikineet useamman kerran, ja niiden poikimisesta oli keskimäärin 113 päivää (keskihajonta 36,3). Kokeen alussa lehmät painoivat keskimäärin 707 kg (keskihajonta 63,2), ja niiden kuntoluokka oli keskimäärin 3,20 (keskihajonta 0,306). Kokeen jälkeen lehmät painoivat keskimäärin 713 kg (keskihajonta 38,9),



ja niiden kuntoluokka oli keskimäärin 3,23 (keskihajonta 0,235). Jakson vaihtuessa lehmiä totutettiin aina muutaman päivän ajan uuteen rehuun. Lehmät olivat parressa.

Koeasetelma oli 2 x 2 faktoriaalinen. Kokeessa tutkittiin rypsirouheen valkuaisen täydellistä korvaamista härkävavun valkuaisella sekä rypsin ja härkävavun valkuaisen osittaista korvaamista Spirulina-levän valkuaisella. Kokeessa oli neljä eri ruokintaa, joista ensimmäisessä valkuaisenlähteenä oli rypsirouhe ja toisessa rypsirouheen ja Spirulina-levän seos. Kolmannessa koeruokinnassa valkuaisrehuna oli jauhettu härkäpapu ja neljännessä härkävavun ja Spirulina-levän seos. Koeruokinnat suunniteltiin niin, että raakavalkuaisen määrä seosrehuissa oli sama eri valkuaisrehuvaihtoehdoista. Mikroleväruokinnossa Spirulina-levän valkuainen korvasi puolet rypsin tai härkävavun valkuaisesta.

#### **4.2 Rehut ja ruokinta**

Kokeessa käytetty säilörehu oli korjattu 22.7.2014 Viikin opetus- ja tutkimustilalla pyöröpaaleihin (Welger Profi RP-235, Welger Maschinenfabrik GmbH, Wolfenbüttel, Saksa). Säilörehu oli toisen sadon esikuivattua nurminata-timoteirehua (siemenseoksessa timotei 36 %, nurminata 45 %, monivuotinen raiheinä 9 %, ruokonata 9 %). Käytetty säilöntäaine oli muurahaishappopohjainen valmiste (AIV 2 Plus, Taminco Finland Oy, Oulu, Suomi) ja annostasona 7,7 l/tn rehua. Koelehmät saivat koeseosrehuja vapaasti (taulukko 3). Seos koostui nurmisäilörehun lisäksi tilalla viljelystä, valssimyllyllä jauhetusta ohrasta, melassileikkeestä (Raimix leike, Raisioagro Oy, Raisio, Suomi) sekä kivennäisestä (Seleeni-E-Melli TMR-kivennäinen, Raisioagro Oy). Kokeessa käytettiin lämpökäsiteltyä rypsirouhetta (Raimix rypsi, Raisioagro Oy) ja tilalla viljeltyä härkäpapua, jonka siemenet jauhettiin valssimyllyllä. Kasvatettu Spirulina-levä tilattiin hollantilaisesta yhtiöstä (Duplico B. V., Hengalo, Hollanti). Väkirehun osuus seosten kuiva-aineesta oli 45 %.

Taulukko 3. Kokeessa käytetty seosrehuresepti eri ruokinnoissa.

Osuus ruokinnan kuiva-aineesta, %	Koekäsittelyt			
	Rypsirouhe	Rypsirouhe + Spirulina	Härkäpapu	Härkäpapu + Spirulina
Säilörehu	55,0	55,0	55,0	55,0
Spirulina	0,00	2,70	0,00	2,70
Rypsirouhe	9,90	5,00	0,00	0,00
Härkäpapu	0,00	0,00	12,2	6,10
Ohra	27,2	29,4	24,8	28,2
Melassileike	6,80	6,80	6,80	6,80
Kivennäinen	1,20	1,20	1,20	1,20
Väkirehu yhteensä	45,0	45,0	45,0	45,0

Koerehut tehtiin maanantaisin, keskiviikkoisin ja perjantaisin. Muina päivinä seosta tehtiin kahden päivän määrä, mutta perjantaisin tehtiin kolmen päivän rehut. Rehunteossa säilörehupaalit silputtiin mikserissä (CutMix, Pellon Group, Ylihärmä, Suomi), jossa yhden paalin annettiin pyöriä 20 min ja kahden paalin vastaavasti 40 min. Pyörimisen loppuvaiheessa rehuun lisättiin 1 l propionihappoa laimennettuna 7 l vettä per 1 000 kg säilörehua seoksen säilyvyyden varmistamiseksi. Säilörehusilppu kulkeutui hihnaa pitkin kiskoruokkijaan (TMR-sukkula M2, Pellon Group, Ylihärmä, Suomi), ja samalla hihnalle lisättiin etukäteen punnitut väkirehut. Väki-rehuun lisättiin punnittu määrä vettä pölyämisen estämiseksi. Seosrehut säilytettiin kylmiössä ruokintaan saakka.

Seosta jaettiin käsin rehukärryistä kolme kertaa päivässä klo 8.30, klo 14.00 ja klo 20.00 jokaisen lehmän omaan vaa'alla varustettuun rehukuppiin (RIC, Roughage Intake Control, Insentec, Alankomaat). Rehukupit tyhjennettiin aamuisin klo 8.00. Jaetut rehumäärät ja rehujätteen määrä ennen rehun lisäystä kirjattiin ylös. Jaettavat rehumäärät päätettiin lehmän edellisen päivän syönnin perusteella. Tavoitteena oli, että päivittäinen jäte olisi noin 5 kg. Rehukuppien vaakojen toiminta tarkastettiin punnuksilla ja tarvittaessa kalibroitiin ennen keruuviikkoa.

Totutusviikoilla säilörehun kuiva-ainetta ja pH:ta tarkkailtiin. Maanantaisin ja perjantaisin määritettiin primäärinen kuiva-aine ja mitattiin pH (S20 SevenEasy™ pH, Mettler-Toledo Ltd, Greifensee, Sveitsi) puristetusta nesteestä. Keruuviikolla jokaiselta rehuntekokerralta otettiin edustavat rehunäytteet säilörehusta (2 kg) ja väkirehuista (3 dl). Säilörehunäytteet pakastettiin -20 °C:ssa. Näytteet sulatettiin ja yhdistettiin rehuittain ja jaksoittain kokeen päätyttyä. Säilörehunäytteistä määritettiin kuiva-aine sekä kuivattiin analyysinäyte. Lisäksi pakastettiin näyte säilörehun käymislaadun analysointia varten. Väkirehunäytteet yhdistettiin rehuittain ja jaksoittain, paitsi kivennäisnäytteet, jotka yhdistettiin yhdeksi näytteeksi koko kokeen ajalta. Väkirehunäytteistä määritettiin myös kuiva-aine sekä otettiin analyysinäyte.

### **4.3 Maitotuotos ja maidon koostumus**

Lehmät lypsettiin kahdesti päivässä klo 6.00 ja klo 17.00 parressa putkilypsykooneella (Delpro, DeLaval, Tumba, Ruotsi). Lehmien lypsämä maitomäärä mitattiin koko kokeen ajan jokaiselta lypsykerralta. Keruuviikolla otettiin maidon koostumusnäytteet erikseen jokaiselta neljältä peräkkäiseltä lypsykerralta (koejakson päivät 18-19) Tru-Test-maitomittarista (Tru Test Ltd, Auckland, Uusi-Seelanti). Maitonäytepikareissa oli Bronopol-säilöntäainepilleri. Näytteistä analysoitiin valkuainen, rasva, laktoosi ja urea infrapuna-analysointilaitteella (Milco Scan FT 6000, Foss, Hillerød, Tanska) Valion Seinäjoen aluelaboratoriossa.

### **4.4 Pötsifermentaatio**

Keruuviikon torstaina otettiin alipainepumpulla 100–150 ml:n näytteet pötsinesteestä blokin 2 fistelöidyiltä lehmiltä puolentoista tunnin välein klo 6.00 alkaen. Näytteet otettiin klo 6.00, 7.30, 9.00, 10.30, 12.00, 13.30, 15.00 ja 16.30. Pötsinesteenäyte suodatettiin harson läpi. Ammoniumtypen määrittämistä varten 25 ml:n näytepulloon pipetoitiin suodatettua pötsinestettä 15 ml ja 0,3 ml 50 % rikkihappoa (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Näyte pakastettiin -20 °C:ssa.

#### 4.5 Sonta- ja virtsanäytteet

Keruuajaksolla kerättiin sontanäytteitä koejakson päivinä 17–20 aina klo 7.00 ja klo 15.30. Sontanäytteet otettiin suoraan peräsuolesta spot-näytteinä 0,5 l pakasterasioihin. Sontanäytteet kerättiin lehmäkohtaisesti jaksoittain ja ne pakastettiin. Myöhemmin sontanäytteet sulatettiin, ja niistä määritettiin kuiva-aine, kuivattiin analyysinäyte ja otettiin tuorenäyte typpianalyysiä varten.

Virtsanäytteet kerättiin koejakson 18. päivänä klo 5.30 ja klo 15.30 alkaen sekä koejakson 19. päivänä klo 10.00 ja klo 19.00 alkaen. Virtsaa kerättiin vähintään 500 ml. Virtsa suodatettiin harsokankaan läpi. Suodosta kaadettiin 300 ml varovasti pulloon, joka sisälsi 15 ml rikkihappoa ( $H_2SO_4$ ) pH:n laskemiseksi. Virtsanäytettä sekoitettiin varovasti, jonka jälkeen tarkistettiin pH-liuskoilla, että pH oli varmasti laskenut alle kolmen ja tarvittaessa rikkihappoa lisättiin. Virtsasta otettiin ensin laimentamattomana 50 ml:n pullo typpianalyysiä varten, jonka jälkeen virtsaa laimennettiin tislattulla vedellä suhteessa 1:10. Laimennettua virtsaa otettiin talteen 20 ml:n pullo kreatiniinin, allantoiinin ja virtsahapon määrittämistä varten. Virtsanäytteet säilytettiin pakkasessa  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa.

#### 4.6 Verinäytteet

Keruuviikon päätteeksi koejakson päivänä 21 otettiin verinäytteet klo 5.30, klo 8.30 ja klo 11.30. Jokaiselta lehmältä otettiin häntä- ja maitosuonesta kummastakin kaksi 10 ml:n EDTA-putkea (etyleenidiamiinitetraetikkahappo ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ )). Verinäytteet säilytettiin jäämurskassa näytteenoton ajan. Plasma erotettiin sentrifugoimalla 2 220 g 10 min (Type 4-15, B.Braun, Melsugen, Germany) ja plasma-näytteet pakastettiin  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa.

#### 4.7 Näytteiden analysointi

Rehu-, sonta-, virtsa- sekä plasmanäytteet analysoitiin Helsingin yliopiston maataloustieteiden laitoksen kotieläintieteen laboratoriossa. Primääristä kuiva-ainetta varten rehua ja sontia kuivattiin lämpökaapissa (Memmert, Memmert GmbH, Schwabach, Saksa) 103 °C:ssa 20–24 tunnin ajan. Analyysinäytettä varten näytteitä kuivattiin lämpökaapissa ensin yhden tunnin ajan 103 °C:ssa ja tämän jälkeen kaksi vuorokautta 50 °C:ssa (rehut) tai 70 °C:ssa (sonnat). Analyysinäytteet jauhettiin 1,0 mm:n (rehut) tai 1,5 mm:n (sonnat) seulalla KT-sakolukumyllyllä (Koneteollisuus, Klaukkala, Suomi) Spirulina-levää lukuun ottamatta. Jauhetuista analyysinäytteistä määritettiin sekundäärinen kuiva-aine samalla tavalla kuin primäärinen kuiva-aine määritettiin.

Säilörehun analyysinäytteestä määritettiin sulavan orgaanisen aineksen osuus (g/kg ka) eli D-arvo, tuhka, raakavalkuainen, neutraalidetergenttikuitu eli NDF, kokonaisrasva ja happoon liukenematon tuhka eli AIA. Säilörehun pakastetusta näytteestä määritettiin maitohappo, haihtuvat rasvahapot, pelkistävät sokerit ja ammoniumtyppi. Väkirehujen analyysinäytteestä määritettiin tuhka, kokonaisrasva, raakavalkuainen, NDF ja AIA. Säilörehusta ja väkirehuista määritettiin myös aminohappokoostumus. Koko kokeen ajalta yhdistetystä kivennäisestä määritettiin primäärinen kuiva-aine, tuhka sekä AIA. Sonnan analyysinäytteestä määritettiin sekundäärinen kuiva-aine, tuhka, NDF ja AIA.

Rehujen, sonnan ja virtsan kokonaistyyppi määritettiin Kjeldahl-menetelmällä (AOAC 1995). Sonnan tyyppipitoisuus analysoitiin tuoreesta näytteestä. Rehujen ja sonnan tuhka määritettiin polttamalla näytteitä 600 °C:ssa 16 tunnin ajan muhveliunissa (Heraeus Thermicon T, Heraeus, Saksa) AOAC:n standardianalyysin No 942.05 (1990) mukaan. Rehujen ja sonnan NDF määritettiin kylmä- ja kuumauuttolaitteessa (Tecator Fibertec System 1020, hot extractor & cold extractor, Foss, Tanska) Van Soestin ym. (1991) mukaan. Säilörehun maitohappo määritettiin Barkerin ja Summersonin (1941) mukaan kolorimetrisesti spektrofotometrillä (Shi-

madzu UV mini 1240, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Saksa). Säilörehun haihtuvat rasvahapot määritettiin nestekromatografilla (Acquity, UPLC, Waters, Milford, Yhdysvallat). Säilörehun sisältämät pelkistävät sokerit määritettiin spektrofotometrillä Salon (1965) mukaan, kuin myös ammoniumtyppi McCulloughin (1967) mukaan. Säilörehun D-arvon määrittämiseen käytettiin Friedelin (1990) pepsiini-sellulaasi-menetelmää sekä Nousiaisen ym. (2003) muunnelmaa ja Huhtasen ym. (2006) korjausyhtälöitä. Virtsan sisältämä kreatiini, allantoiini ja virtsahappo määritettiin UPLC-menetelmällä Georgen ym. (2006) mukaan.

Rehujen aminohappomäärittystä varten rehunäytteet hydrolysoitiin Korhosen ym. (2002) kuvaamalla tavalla noudattaen direktiiviä 98/64/EC (European Commission, 1998). Hydrolysoidut näytteet analysoitiin UPLC-laitteella (Waters Acquity UPLC, Waters, Milford, MA, Yhdysvallat), jossa oli BEH C18 kolonni (100 mm × 2.1mm) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Verinäytteistä määritettiin plasman aminohapot nestekromatografilla (Waters Acquity UPLC, Waters) käyttäen Waters MassTrak AAA kolonnia (186004097, Waters). Rehujen kokonaisrasvapitoisuus määritettiin petroolieetteriuutolla HCl-hydrolyysin jälkeen (FOSS Soxtec 8000 uuttoyksikkö, SoxCap 2047 hydrolyysiyksikkö, FOSS Analytical, Hillerød, Tanska). Rehujen ja sonnan AIA-pitoisuus määritettiin Van Keulenin ja Youngin (1977) mukaan.

Säilörehun muuntokelpoisen energian määrä laskettiin kertomalla säilörehun sulavan orgaanisen aineksen osuus eli D-arvo kertoimella 0,016 (Luke 2015). Rypsi-rouheen ja melassileikkeen muuntokelpoisen energian määrä on valmistajan ilmoittama. Muiden rehujen muuntokelpoisen energian määrä on rehutaulukoista (Luke 2015) Spirulinaa lukuun ottamatta. Spirulinan muuntokelpoisen energian arvo laskettiin kertomalla sen D-arvo kertoimella 0,016. Spirulinan D-arvoa ei määritetty tässä kokeessa, vaan laskennassa käytettiin kirjallisuudessa (NRC 1983) leville ilmoitettua D-arvoa (622 g/kg ka). Rehujen sisältämä ohutsuoletta imeytyvän valkuaisen eli OIV:n määrä sekä pötsin valkuaisaseen eli PVT:n määrä laskettiin rehutaulukoiden (Luke 2015) laskentaohjeiden ja rehuarvojen mukaan. Spirulinan valkuaiselle käytettiin laskuissa hajoavan valkuaisen osuutta 0,80.

#### 4.8 Tulosten laskenta ja tilastollinen analyysi

Tulokset laskettiin keruuviikon (jakson päivät 15–21) tuloksista. Säilörehun kuiva-ainetulokset korjattiin Huidan ym. (1986) mukaan. Rehun ja sonnan orgaanisen aineen pitoisuus laskettiin siten, että vähennettiin kuiva-aineesta (g/kg ka) tuhkan määrä (g/kg ka). Rehun ja sonnan raakavalkuaispitoisuus saatiin kertomalla kokonaistyyppi kertoimella 6,25. Maidon sisältämä typhen määrä (g/pv) saatiin jakamalla maidon raakavalkuainen (g/pv) luvulla 6,38. Pötsin mikrobityphen määrä arvioitiin virtsan puriini johdannaisten avulla (Chen ja Gomez, 1992). Virtsan kokonaismäärä arvioitiin virtsan kreatiinipitoisuuden ja lehmien elopainon perusteella.

Muuntokelpoisen energian saanti korjattiin yhdysvaikutusten varalta (Luke, 2015) mukaan seuraavasti:

Korjattu ME-saanti (MJ/pv) = korjaamaton ME-saanti (MJ/pv) - (-56,7 + 6,99 x MEyp + 1,621 x kuiva-aineen syönti - 0,44595 x rvpit + 0,00112 x rvpit<sup>2</sup>).

Yhtälössä MEyp = rehuannoksen korjaamaton ME-pitoisuus (MJ/kg ka) ja rvpit = rehuannoksen raakavalkuaispitoisuus (g/kg ka).

Energiakorjattu maitotuotos (ekm) laskettiin Sjaunjan ym. (1990) mukaan seuraavasti:

ekm (kg) = maitotuotos (kg) x (38,3 x rasvapitoisuus (g/kg) + 24,2 x valkuaispitoisuus (g/kg) + 16,54 x laktoosipitoisuus (g/kg) + 20,7) / 3140.

Plasman virtaus maitorauhaseen määritettiin Fick'in periaatteen (Fleet ja Mephram, 1983) mukaan perustuen fenyylialaniinin ja tyrosiinin siirtymiseen plasmasta maitovalkuaiseen (Cant ym. 1993). Maitorauhasen aminohappojen otto määritettiin Halmemies-Beauchet-Filleaun ym. (2013) mukaan.

AV-erotus = (pitoisuus valtimoveressä - pitoisuus laskimoveressä)

Maitorauhasen aminohappojen ottoprosentti plasmasta laskettiin seuraavasti:

Otto- % plasmasta = (pitoisuus valtimoveressä – pitoisuus laskimoveressä) / pitoisuus valtimoveressä.

Lypsylehmän typpitase laskettiin seuraavasti:

Typpitase = rehun N (g/pv) – (maidon N (g/pv) + sonnan N (g/pv) + virtsan N (g/pv)).

Tilastollisessa analyysissä käytettiin SAS:in Mixed Proceduren versiota 9.3. Varianssianalyysissä käytetty tilastomalli oli seuraava:

$$y_{ijklm} = \mu + S_i + A(S)_{ij} + P_k + D_l + (S * D)_{il} + F_{ijklm}$$

Mallissa  $\mu$  = keskiarvo,  $S$  = neliön vaikutus,  $A(S)$  = eläimen vaikutus neliön sisällä,  $P$  = jakson vaikutus,  $D$  = ruokinnan vaikutus,  $S * D$  = blokin ja ruokinnan yhdysvaikutus ja  $F$  = virhetermi.

Analyysissä käytettiin seuraavia ortogonaalisia kontrasteja: 1. härkävavun vertaaminen rypsiin (rypsi ja rypsi + Spirulina vs. härkävavun ja härkävavun + Spirulina), 2. härkävavun ja rypsin valkuaisen osittainen korvaaminen Spirulina-levän valkuaisella ja 3. mahdollinen yhdysvaikutus Spirulinan ja härkävavun tai rypsin välillä.

Tuloksissa P-arvon ollessa  $P < 0.001$  vaikutus on erittäin merkitsevä,  $P < 0.01$  on hyvin merkitsevä,  $P < 0.05$  on merkitsevä ja  $P < 0.1$  on suuntaa-antava.



## 5 TULOKSET

### 5.1 Rehujen kemiallinen koostumus

Kokeessa käytetyn nurmisäilörehun sulavan orgaanisen aineksen osuus oli 681 g/kg ka (taulukko 4). Säilörehun raakavalkuaispitoisuus oli 159 g/kg ka ja NDF:n pitoisuus 505 g/kg ka. Valkuaisrehuista Spirulinan raakavalkuaispitoisuus oli rypsiroheen ja härkävavun siementen raakavalkuaispitoisuutta suurempi. Spirulinan kuiva-ainepitoisuus oli myös rypsiä ja härkävapua suurempi. Rypsi sisälsi enemmän tuhkaa ja NDF:ää kuin härkävapua ja Spirulina, mutta valkuaisrehuista Spirulinan kokonaisrasvapitoisuus oli suurin. Kokeessa käytetyistä valkuaisrehuista Spirulinan valkuainen sisälsi vähiten histidiiniä. Härkävavun valkuainen puolestaan sisälsi eniten lysiniä ja histidiiniä, mutta vähiten metioniinia.

### 5.2 Rehujen syönti ja ravintoaineiden saanti

Lämpökäsitellyn rypsiroheen ja jauhetun härkävavun välillä ei ollut merkitsevää eroa lypsylehmien kuiva-aineen syönnissä (taulukko 5). Kun rypsin ja härkävavun valkuaisesta puolet korvattiin Spirulina-levän valkuaisella, lehmien seosrehun syönti väheni keskimäärin 0,6 kg ka/pv ( $P < 0,05$ ). Spirulina näin ollen vähensi myös orgaanisen aineen syöntiä ( $P < 0,05$ ). Raakavalkuaisen saannissa ei ollut eroja, mutta kokonaisrasvan saanti oli pienempää härkävapuruoikinnoissa kuin rypsirookinnoissa ( $P < 0,001$ ). Pötsin valkuaisaste oli positiivinen kaikissa koeruokinnoissa (602-762 g/pv). Pötsin valkuaisaste oli suurempi härkävapua- kuin rypsirookinnoissa ( $P < 0,001$ ) ja Spirulina suurensi sitä enemmän härkävapua- kuin rypsirookinnoissa ( $P < 0,001$  yhdysvaikutus). Ohutsuolet imeytyvän valkuaisen saanti oli pienempi härkävapua- kuin rypsirookinnoissa ( $P < 0,01$ ). Kun rypsin ja härkävavun valkuaisesta puolet korvattiin Spirulina-levän valkuaisella, ohutsuolet imeytyvän valkuaisen saanti väheni ( $P = 0,01$ ). NDF:n saanti oli myös pienempää härkävapuruoikinnoissa kuin rypsirookinnoissa ( $P < 0,001$ ). Rypsin ja härkävavun korvaaminen Spirulinalla vähensi myös NDF:n saantia ( $P < 0,01$ ).

Taulukko 4. Kokeessa käytetyn säilörehun ja väkirehujen kemiallinen koostumus.

	Säilörehu <sup>1</sup>	Ohra	Melassileike	Valkuaisrehut			Kivennäinen
				Rypsirouhe	Härkäpapu	Spirulina	
Muuntokelpoinen energia, MJ/kg ka	10,9	13,2	12,8	11,4	12,8	10,0	
Kuiva-aine, g/kg	293	873	878	877	872	946	994
Kuiva-aineessa, g/kg							
Tuhka	107	25,0	71,0	84,0	43,0	68,0	885
NDF	505	193	356	366	145	0,00	
Kokonaisrasva	37,8	26,1	34,4	41,1	15,0	56,3	
Raakavalkuainen	159	121	169	345	310	683	
Ohutsuolesta imeytyvä valkuainen	83,2	96,7	114	167	124	159	
Pötsin valkuaiastase	35,3	-23,7	5,01	123	133	473	
Raakavalkuaisessa, g/kg							
Arginiini	26,5	54,7	56,9	55,8	92,5	71,4	
Fenyylialaniini	36,5	48,8	36,5	35,9	37,2	41,8	
Histidiini	11,4	20,8	23,5	21,3	22,8	14,7	
Isoleusiini	31,7	34,9	35,0	37,6	37,7	52,9	
Leusiini	56,1	65,0	61,2	64,9	66,2	82,3	
Lysiini	28,4	36,8	43,3	48,0	55,9	44,9	
Metioniini	10,8	12,0	14,5	15,6	5,22	18,3	
Treoniini	28,1	32,7	39,8	43,2	31,5	46,6	
Tryptofaani	8,28	10,9	11,7	11,4	7,10	11,5	
Valiini	40,9	47,9	46,2	47,7	41,4	59,0	
Kaikki aminohapot yhteensä	578	924	821	842	843	915	

<sup>1</sup>Säilörehun pH 4,48, sulavan orgaanisen aineen osuus (D-arvo) 681 g/kg ka, maitohappo 35,9 g/kg ka, sokerit 90,8 g/kg ka, etikkahappo 9,52 g/kg ka, propionihappo 5,92 g/kg ka, voihiappo <0,01 g/kg ka sekä ammoniumtypen osuus kokonaistypestä 95,2 g/kg N.

Koedieettien raakavalkuaispitoisuus oli 165–170 ja NDF-pitoisuus 370–395 g/kg ka. Orgaanisen aineen ja raakavalkuaisen pitoisuudet dieetissä olivat suuremmat härkäpapuruokinnoissa kuin rypsirokuinnoissa, vaikkakin numeeriset erot olivat hyvin pieniä ( $P < 0,001$ ). Spirulina lisäsi dieetin orgaanisen aineen ja raakavalkuaisen pitoisuuksia ( $P < 0,001$ ), mutta vähensi dieetin NDF-pitoisuutta ( $P < 0,001$ ). Dieetin NDF-pitoisuus oli myös pienempi härkäpapuruokinnoissa kuin rypsirokuinnoissa ( $P < 0,001$ ). Härkäpapuruokinnoissa metioniinin saanti oli pienempi kuin rypsirokuinnoissa ( $P < 0,001$ ), kun taas lysiinin saanti oli suurempi kuin rypsirokuinnoissa ( $P < 0,05$ ) (taulukko 6). Spirulinan korvatessa puolet härkäpavun valkuaisesta metioniinin saanti lisääntyi enemmän kuin Spirulinan korvatessa rypsiä (yhdysvaikutus,  $P = 0,01$ ). Kun Spirulina korvasi osittain rypsiä ja härkäpapua, histidiinin saanti väheni ( $P < 0,01$ ).

### 5.3 Maitotuotos ja maidon koostumus

Maitotuotos oli suurempi rypsirokuinnassa verrattuna härkäpapuruokintaan (taulukko 7). Rypsi lisäsi tuotosta 1,4 kg härkäpapuun verrattuna ( $P < 0,001$ ). Kun Spirulina-levä korvasi osittain härkäpapua, maitotuotos suureni verrattuna pelkkään härkäpapuruokintaan, mutta kun Spirulina-levä korvasi osittain rypsirokuinnoita, maitotuotos pieneni pelkkään rypsirokuokintaan verrattuna (yhdysvaikutus,  $P < 0,01$ ). Rypsirokuinnoissa myös energiakorjatun maidon määrä oli 1,4 kg suurempi kuin härkäpapuruokinnoissa ( $P < 0,01$ ). Rypsirokuinnassa ja härkäpapuruokinnassa maidon koostumuksessa ei ollut merkitseviä eroja. Rypsin valkuaisen korvaaminen Spirulinalla vaikutti maidon koostumukseen eri tavoin kuin härkäpavun valkuaisen korvaaminen Spirulinalla (yhdysvaikutus,  $P < 0,05$ ). Kun Spirulina korvasi osittain rypsiä, maidon rasva- ja valkuaispitoisuudet suurensivat verrattuna pelkkään rypsirokuokintaan. Kun Spirulina korvasi osittain härkäpapua, maidon rasva- ja valkuaispitoisuudet pienensivät verrattuna pelkkään härkäpapuruokintaan.

Taulukko 5. Rehujen syönti ja ravintoaineiden saanti

	Koekäsittelyt				SEM	Merkitsevydet		
	Rypsirouhe	Rypsirouhe + <i>Spirulina</i>	Härkäpapu	Härkäpapu + <i>Spirulina</i>		Rypsirouhe vs. härkäpapu	Korvaaminen <i>Spirulinalla</i>	Yhdysvaikutus
Syönti, kg/pv								
Kuiva-aine	23,3	22,8	23,1	22,3	0,57	0,198	0,037	0,500
Orgaaninen aine	21,2	20,8	21,1	20,3	0,52	0,281	0,042	0,450
Raakavalkuainen	3,86	3,88	3,84	3,77	0,098	0,246	0,581	0,370
Ohutsuoletta imeytyvä valkuainen	2,23	2,15	2,13	2,06	0,54	0,003	0,010	0,919
Pötsin valkuaiastase	0,602	0,731	0,702	0,762	0,0170	<0,001	<0,001	<0,001
Neutraalidetergenttikuitu	9,17	8,69	8,60	8,27	0,217	<0,001	0,002	0,463
Kokonaisrasva	0,803	0,784	0,733	0,735	0,0197	<0,001	0,435	0,311
Korjattu muuntokelpoisen energian saanti, MJ/pv	250	246	250	241	5,7	0,434	0,032	0,388
Dieetissä, g/kg ka								
Orgaaninen aine	910	912	914	914	0,00	<0,001	<0,001	<0,001
Neutraalidetergenttikuitu	395	381	373	370	0,02	<0,001	<0,001	<0,001
Raakavalkuainen	165	169	166	170	0,01	<0,001	<0,001	0,023
Ohutsuoletta imeytyvä valkuainen	95,7	94,0	92,3	92,3	0,03	<0,001	<0,001	<0,001
Pötsin valkuaiastase	25,9	32,0	30,4	34,2	0,06	<0,001	<0,001	<0,001
Muuntokelpoinen energia, MJ/kg ka	11,5	11,5	11,7	11,6	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001

Taulukko 6. Aminohappojen saanti eri koeruokinoissa.

	Koekäsittelyt				SEM	Merkitsevydet		
	Rypsirouhe	Rypsirouhe	Härkäpapu	Härkäpapu		Rypsirouhe	Korvaaminen	Yhdysvaikutus
		+ <i>Spirulina</i>		+ <i>Spirulina</i>		vs. härkäpapu	<i>Spirulinalla</i>	
Välttämättömät aminohapot, g/pv								
Arginiini	152	161	183	172	4,2	<0,001	0,617	<0,001
Fenyylialaniini	149	153	149	149	3,7	0,308	0,237	0,386
Histidiini	61,5	59,6	62,6	58,8	1,52	0,960	0,002	0,222
Isoleusiini	130	137	130	134	3,3	0,327	0,003	0,353
Leusiini	230	239	230	234	5,8	0,418	0,04	0,336
Lysiini	134	134	141	135	3,4	0,036	0,067	0,062
Metioniini	47,1	48,6	38,5	43,4	1,14	<0,001	<0,001	0,010
Treoniini	126	128	116	121	3,1	<0,001	0,033	0,507
Tryptofaani	37,0	37,4	33,3	34,8	0,9	<0,001	0,051	0,234
Valiini	169	175	163	169	4,2	0,008	0,014	0,831

Maidon rasva-valkuaisuhde oli rypsi-ruokinnassa 1,30, rypsi-levä -ruokinnassa 1,33, härkäpapuruokinnassa 1,33 ja härkäpapu-levä -ruokinnassa 1,33. Rypsi-ruokinnassa valkuaisuus (P<0,001) ja laktoosituotos (P<0,01) sekä suuntaantavasti myös rasvatuotos (P=0,074) olivat suuremmat kuin härkäpapuruokinnassa. Rypsin valkuaisen korvaaminen Spirulinalla vaikutti maidon valkuais- ja laktoosituotokseen eri tavoin kuin härkäpapun valkuaisen korvaaminen Spirulinalla (yhdysvaikutus, P<0,06). Kun Spirulina korvasi osittain rypsiä, valkuais- ja laktoosituotokset olivat pienemmät kuin pelkässä rypsi-ruokinnassa. Kun Spirulina korvasi osittain härkäpapua, valkuais- ja laktoosituotokset olivat suuremmat kuin pelkässä härkäpapuruokinnassa.

Maidon ureapitoisuus oli suurempi härkäpapuruokinnassa (29,9 mg/dl) kuin rypsi-ruokinnassa (28,0 mg/dl) (P<0,001). Kun Spirulina-levä korvasi osittain rypsiä, maidon ureapitoisuus lisääntyi pelkkään rypsi-ruokintaan verrattuna, ja kun Spirulina korvasi osittain härkäpapua, maidon ureapitoisuus puolestaan väheni pelkkään härkäpapuun verrattuna (yhdysvaikutus, P<0,01). Tässä tutkimuksessa härkäpapuruokinnassa (1,39) rehun hyväksikäyttö maidontuotantoon jäi rypsi-ruokintaa (1,43) pienemmäksi, kun sitä kuvattiin energiakorjatun maidon tuotoksena (kg/pv) syötyä kuiva-aineen määrää (kg/pv) kohti (P<0,05). Spirulina-levän lisääminen härkäpapuruokintaan kuitenkin nosti rehun hyväksikäytön maidontuotantoon samalle tasolle kuin rypsi-ruokinnassa (yhdysvaikutus, P<0,05).

Taulukko 7. Maitotuotokset, maidon koostumus ja maidontuotannon tehokkuus.

	Käsittelyt				SEM	Merkitsevyydet		
	Rypsirouhe	Rypsirouhe + <i>Spirulina</i>	Härkäpapu	Härkäpapu + <i>Spirulina</i>		Rypsirouhe vs. Härkäpapu	Korvaaminen <i>Spirulinalla</i>	Yhdysvaikutus
Tuotos								
Maitoa, kg/pv	31,0	30,0	28,5	29,7	0,53	<0,001	0,857	0,002
EKM <sup>1</sup> , kg/pv	34,1	33,8	32,3	32,9	0,86	0,006	0,696	0,303
Rasva, g/pv	1469	1483	1414	1433	51,9	0,074	0,552	0,942
Valkuainen, g/pv	1127	1106	1050	1070	23,4	<0,001	0,959	0,058
Laktoosi, g/pv	1383	1328	1276	1320	27,0	0,002	0,718	0,005
Pitoisuudet								
Rasva, g/kg	47,4	49,4	49,2	48,1	0,146	0,694	0,562	0,042
Valkuainen, g/kg	36,5	37,1	36,9	36,2	0,080	0,192	0,911	0,004
Laktoosi, g/kg	44,6	44,2	44,6	44,4	0,036	0,673	0,334	0,824
Urea, mg/dl	27,0	28,9	30,2	29,6	1,52	<0,001	0,117	0,008
Rehun hyväksikäyttö								
EKM/ka-syönti, kg/kg	1,42	1,44	1,35	1,43	0,004	0,026	0,011	0,050

<sup>1</sup> Energiakorjattu maitotuotos

#### 5.4 Plasman aminohapot sekä maitorauhasen aminohappometabolia

Rypsirokinnoissa välttämättömien aminohappojen kokonaispitoisuus valtimoveressä oli suurempi kuin härkäpapuruokinnoissa ( $P < 0,001$ ) (taulukko 8). Valtimoveren fenyylialaniinin, leusiinin ja valiinin ( $P < 0,001$ ), arginiinin ja metioniinin ( $P < 0,01$ ) sekä histidiinin, isoleusiinin ja lysiinin ( $P < 0,05$ ) ja suuntaa-antavasti tryptofaanin ( $P = 0,064$ ) pitoisuudet olivat suuremmat rypsirokinnessa kuin härkäpapuruokinnessa. Rypsin tai härkäpavun valkuaisen osittainen korvaaminen Spirulinalla ei vaikuttanut valtimoveren aminohappopitoisuuksiin. Ainoastaan tryptofaanin pitoisuus oli suuntaa-antavasti suurempi, kun Spirulina korvasi osittain härkäpapua verrattuna pelkkään härkäpapuruokintaan, mutta kun Spirulina korvasi osittain rypsiä, tryptofaanin pitoisuus väheni verrattuna pelkkään rypsirokinnaan (yhdysvaikutus,  $P < 0,10$ ).

Maitorauhasen välttämättömien aminohappojen valtimo-laskimo -erotus (AV-erotus) oli suurempi puhtaassa rypsirokinnessa kuin puhtaassa härkäpapuruokinnessa (taulukko 12 liitteenä). Leusiinin ja valiinin ( $P < 0,001$ ) sekä fenyylialaniinin ( $P < 0,01$ ), arginiinin ja histidiinin ( $P < 0,05$ ) AV-erotukset olivat suuremmat rypsirokinnessa kuin härkäpapuruokinnessa. Kun Spirulina korvasi osittain rypsiä, välttämättömien aminohappojen (yhdysvaikutus,  $P < 0,01$ ) sekä aminohappojen kokonaiserotus (yhdysvaikutus,  $P < 0,05$ ) pienenevät verrattuna pelkkään rypsirokinnaan. Sen sijaan härkäpavun korvaaminen osittain Spirulinalla suurensi välttämättömien aminohappojen sekä aminohappojen kokonaiserotusta. Kun rypsiä korvattiin osittain Spirulinalla, arginiinin ja valiinin (yhdysvaikutus,  $P < 0,01$ ) sekä isoleusiinin, leusiinin, lysiinin ja fenyylialaniinin (yhdysvaikutus,  $P < 0,05$ ) AV-erotukset pienenevät verrattuna pelkkään rypsirokinnaan. Kun härkäpapua korvattiin osittain Spirulinalla, kyseisten aminohappojen AV-erotukset suurenevat verrattuna pelkkään härkäpapuruokintaan.

Maitorauhanen otti (mmol/pv) välttämättömistä aminohapoista enemmän fenyylialaniinia ( $P < 0,01$ ) ja metioniinia ( $P < 0,05$ ) rypsirokinnessa kuin härkäpapuruo-



kinnassa (taulukko 9). Maitorauhanen otti suuntaa-antavasti enemmän myös histidiiniä ( $P=0,069$ ) ja leusiinia ( $P=0,058$ ) rypsi-ruokinnassa kuin härkäpapuruokinnassa. Leväruokinnoissa maitorauhanen otti vähemmän metioniinia ( $P<0,01$ ) sekä suuntaa-antavasti vähemmän treoniinia ( $P=0,072$ ) puhtaaseen rypsi- tai härkäpapuruokintaan verrattuna. Maitorauhanen välttämättömien aminohappojen ottoprosenteista plasmasta ei ollut eroja rypsi-ruokinnassa ja härkäpapuruokinnassa (taulukko 11 liitteenä). Maitorauhanen otti plasmasta tehokkaammin fenyylialaniinia (yhdysvaikutus,  $P<0,01$ ) sekä arginiinia, leusiinia ja metioniinia (yhdysvaikutus,  $P<0,05$ ) härkäpapu-Spirulina -ruokinnassa kuin pelkässä härkäpapuruokinnassa. Puolestaan rypsi-Spirulina -ruokinnassa maitorauhanen otti plasmasta tehottomammin kyseisiä aminohappoja kuin pelkässä rypsi-ruokinnassa.

Taulukko 8. Valtimoveren aminohappopitoisuudet.

Aminohapot, µmol/L	Koekäsittelyt				SEM	Merkitsevyydet		
	Rypsirouhe	Rypsirouhe + <i>Spirulina</i>	Härkäpapu	Härkäpapu + <i>Spirulina</i>		Rypsirouhe vs. Härkäpapu	Korvaaminen <i>Spirulinalla</i>	Yhdysvaikutus
Välttämättömät aminohapot								
Arginiini	77,2	72,2	67,2	65,9	3,90	0,003	0,170	0,411
Fenyylialaniini	45,0	44,6	41,0	40,7	1,68	<0,001	0,662	0,970
Histidiini	36,7	39,2	32,3	33,0	3,29	0,048	0,522	0,733
Isoleusiini	112	118	113	112	5,2	0,047	0,452	0,571
Leusiini	120	122	105	106	4,8	<0,001	0,569	0,991
Lysiini	95,9	91,9	86,8	86,3	4,92	0,014	0,395	0,515
Metioniini	23,9	23,3	20,8	20,7	1,19	0,007	0,655	0,732
Treoniini	104	101	97,9	105	4,65	0,692	0,464	0,101
Tryptofaani	33,3	30,9	30,1	31,0	1,29	0,064	0,319	0,049
Valiini	235	230	210	215	8,1	<0,001	0,946	0,346
Välttämättömät aminohapot	894	873	803	815	27,7	<0,001	0,794	0,357
Ei-välttämättömät aminohapot	1586	1571	1596	1633	41,0	0,188	0,677	0,338
Aminohapot yhteensä	2481	2444	2400	2449	60,1	0,349	0,873	0,296

Taulukko 9. Maitorauhasen aminohappojen otto.

Aminohapot, mmol/pv	Koekäsittelyt				SEM	Merkitsevyydet		
	Rypsirouhe	Rypsirouhe + <i>Spirulina</i>	Härkäpapu	Härkäpapu + <i>Spirulina</i>		Rypsirouhe vs. Härkäpapu	Korvaaminen <i>Spirulinalla</i>	Yhdysvaikutus
Välttämättömät aminohapot								
Arginiini	516	515	469	521	30,0	0,504	0,413	0,390
Fenyylialaniini	353	348	321	326	6,76	0,001	0,996	0,369
Histidiini	221	239	181	194	23,7	0,069	0,493	0,910
Isoleusiini	717	695	723	678	39,5	0,889	0,417	0,776
Leusiini	974	988	922	899	34,5	0,058	0,891	0,605
Lysiini	816	847	837	829	37,8	0,967	0,768	0,612
Metioniini	209	194	196	186	7,0	0,026	0,008	0,556
Treoniini	466	485	474	532	26,8	0,191	0,072	0,353
Tryptofaani	79,1	92,0	86,2	98,7	8,48	0,404	0,135	0,980
Valiini	926	943	859	877	40,1	0,117	0,666	0,999
Välttämättömät aminohapot	5277	5347	5023	5140	202,3	0,246	0,631	0,903
Ei-välttämättömät aminohapot	4218	4191	4373	4623	251,1	0,184	0,604	0,520
Aminohapot yhteensä	9495	9537	9087	9763	318,3	0,705	0,147	0,197

## 5.5 Typpitase ja typen jakautuminen

Pötsin ammoniakkipitoisuus oli suurempi puhtaassa härkäpapuruokinnassa kuin puhtaassa rypsirokinnessa (taulukko 10). Kun rypsiä korvattiin osittain Spirulinalla, pötsin ammoniakkitypen pitoisuus suureni verrattuna pelkkään rypsirokinnaan. Kun härkäpapua korvattiin osittain Spirulinalla, pötsin ammoniakkipitoisuus puolestaan väheni verrattuna pelkkään härkäpapuruokintaan (yhdysvaikutus,  $P < 0,01$ ). Mikrobitypen tuotanto pötsissä lisääntyi lähes suuntaa-antavasti, kun Spirulina korvasi rypsiä ja härkäpapua ( $P = 0,109$ ).

Typen saannissa ei ollut eroja eri koeruoikintojen välillä. Typpitase oli positiivinen kaikissa koeruoikunnoissa. Rypsin ja härkäpavun valkuaisen korvaaminen Spirulinalla pienensi suuntaa-antavasti typpitaseita ( $P = 0,089$ ). Härkäpapuruokinnassa erittyi typpeä (g/pv) vähemmän maidossa ( $P < 0,001$ ) ja sonnassa ( $P < 0,05$ ) kuin rypsirokinnoissa. Kun Spirulina korvasi osittain rypsirouhetta, typen erittyminen maidossa väheni suuntaa-antavasti verrattuna pelkkään rypsirookintaan. Kun Spirulina korvasi osittain härkäpapua, typen erittyminen maidossa puolestaan suuntaa-antavasti lisääntyi (yhdysvaikutus,  $P = 0,058$ ).

Härkäpapuruokinnoissa rehutypestä eritettiin pienempi osuus (%) maitoon ( $P < 0,01$ ) ja sontaan ( $P < 0,05$ ) kuin rypsirokinnoissa. Kun rypsin ja härkäpavun valkuaista korvattiin osittain Spirulinalla, virtsaan eritettävän rehutypen osuus lisääntyi ( $P = 0,071$ ). Spirulinan korvatessa rypsiä rehutypen hyväksikäyttö maitovalkuaiseksi huononi verrattuna pelkkään rypsirookintaan. Puolestaan Spirulinan korvatessa härkäpapua typen hyväksikäyttö maitovalkuaiseksi parani verrattuna pelkkään härkäpapuruokintaan (yhdysvaikutus,  $P < 0,05$ ).

Taulukko 10. Typen jakautuminen ja typpitaseet

	Koekäsittelyt				SEM	Merkitsevyydet			Dieetti x aika
	Rypsirouhe	Rypsirouhe + <i>Spirulina</i>	Härkäpapu	Härkäpapu + <i>Spirulina</i>		Rypsirouhe vs. Härkäpapu	Korvaa- minen <i>Spirulinalla</i>	Yhdysvai- kutus	
Saanti									
Typpi, g/pv	617	620	615	604	15,7	0,260	0,570	0,390	
Typen erittyminen, g/pv									
Typpi maidossa	177	173	165	168	3,7	<0,001	0,970	0,058	
Typpi sonnassa	203	202	189	193	6,7	0,027	0,769	0,587	
Typpi virtsassa	194	208	200	214	11,3	0,498	0,119	0,954	
Typpitase	44,4	36,6	60,9	29,3	11,23	0,679	0,089	0,287	
Typen jakautuminen, %									
Typpi maidossa	29,0	28,1	26,8	27,9	0,82	0,007	0,756	0,023	
Typpi sonnassa	32,9	32,6	30,9	32,0	0,58	0,028	0,429	0,221	
Typpi virtsassa	31,4	34,1	33,0	35,5	1,59	0,284	0,071	0,928	
Mikrobitypen tuotanto, g/pv	263	273	264	275	9,4	0,874	0,109	0,974	
Pötsinesteen ammoniakkipitoisuus, mmol/l	6,12	8,54	9,37	8,43	0,681	0,003	0,102	0,002	0,117

## 6 TULOSTEN TARKASTELU

### 6.1 Rehut ja syönti

Kokeessa käytetty nurmisäilörehu oli ruokinnalliselta arvoltaan hyvää. Rehussa oli hyvä sulavan orgaanisen aineen osuus, sillä säilörehun D-arvo oli 681 g/kg ka. Säilörehun D-arvo kuvaa rehun energia-arvoa ja se selittää myös parhaiten säilörehun syöntiä. Säilörehun D-arvon suureneminen lisää säilörehun syöntiä ja rehun muuntokelpoisen energian määrää. D-arvon ohella säilörehun syöntiin vaikuttavat muun muassa kasvilaji ja se, onko kyseessä ensimmäinen sato vai jälkikasvusato (Huhtanen ym. 2007). Tässä kokeessa käytetty säilörehu oli toista satoa, eli se on mahdollisesti voinut vähentää syöntiä, vaikka syönti tässä kokeessa olikin hyvä. Säilörehun raakavalkuaispitoisuus oli myös hyvä 159 g/kg ka. Rehun raakavalkuaispitoisuuden vaikuttavat kasvilajin (Koivunen ym. 2015) ohella pellon satotaso ja nurmen saama typpilannoitus (Peyraud & Astigarraga 1998). Peltoon laitettiin typpeä yhteensä 173,8 kg kasvukauden aikana. Pellon laskennallinen typpitase oli -56,1 kg vuoden lopussa. Nurmen D-arvon ja biomassan määrän välillä on negatiivinen korrelaatio, ja lohkon toinen sato (noin 8500 kg/ha) oli pienehkö näin aikaisessa kasvuvaiheessa. Tämä selittänee rehun suhteellisen suurta raakavalkuaispitoisuutta. Puhakka ym. (2012) ovat esittäneet, että palkoviljat soveltuisivat täydentämään ruokintaa, jossa säilörehun raakavalkuaispitoisuus on pieni. Tällöin runsaasti pötsissä hajoavaa valkuaista sisältävät palkoviljat toisivat pötsiin lisää typpeä mikrobivalkuaisen raaka-aineeksi.

Säilörehussa oli suhteellisen vähän NDF:ää (505 g/kg ka), mikä vastaa tyypillisesti toisesta sadosta tehdyn säilörehun kuitupitoisuutta rehun sulavuuden ollessa korkea (Luke 2015). Säilörehu oli korjattu aikaisessa vaiheessa ja sen D-arvo oli suuri. Aikaisessa kasvuvaiheessa kuidun pitoisuus kasvissa on vielä pieni, ja se lisääntyy kasvin vanhetessa. Kokeessa käytetty Spirulina ei sisältänyt lainkaan NDF:ää kuten ei Ylisen ym. (2015) ja Lammisen ym. (2016) tutkimuksissakaan. Myös Panjaitanin ym. (2015) kokeessa Spirulinan NDF-pitoisuus oli hyvin pieni 35 g/kg ka. Tässä kokeessa NDF:n saanti sekä NDF-pitoisuus dieetissä pienenevät, kun Spirulina

korvasi rypsiä ja härkäpapua. Toisaalta kokeessa ei havaittu lehmillä kuidun vähäiseen saantiin viittaavia oireita, kuten hapanta pötsiä tai sorkkaongelmia.

Nurmisäilörehu oli säilönnälliseltä laadultaan kohtalaista. Säilörehun pH-arvo (4,84) oli suuri rehun kuiva-ainepitoisuuteen (293 g/kg) nähden, mitä selittää säilöntäaineen suuri annostaso. Tällöin suuri happomäärä on estänyt maitohappokäymistä, jolloin muodostunut vähäinen maitohappomäärä ei ole laskenut rehun pH:ta. Rehu sisälsi runsaasti raakavalkuaista, mutta osa siitä oli hajonnut ammoniumtypeksi sekä liukoiseksi typeksi. Ammoniakkitypen määrä rehussa oli 95 g/kg-N, joka tosin sisältää myös säilöntäaineessa lisätyn ammoniumformiaatin vaikutuksen. Säilörehussa haitallisesta käymisestä kertovien haihtuvien rasvahappojen määrä oli kuitenkin pieni (15 g/kg ka), ja erityisesti virhekäymisestä kertovan voihapon määrä oli erittäin pieni <0,01 g/kg ka. Rehussa oli vielä jäljellä runsaasti sokeria (91 g/kg ka) ja vähän maitohappoa (36 g/kg ka). Voidaan päätellä, että rehu oli rajoittuneesti käynyttä, koska pitkälle käyneessä säilörehussa sokeri käy maitohapoksi. Huhtasen ym. (2007) mukaan säilörehun syöntiä heikentää rehun pieni kuiva-ainepitoisuus, pieni D-arvo ja suuri NDF-pitoisuus. Myös maitohapon ja haihtuvien rasvahappojen suuret pitoisuudet vähentävät syöntiä.

Tässä kokeessa käytetty rypsirouhe sisälsi vähemmän raakavalkuaista (345 g/kg ka) kuin rehutaulukoissa (2015) on esitetty (379 g/kg ka). Härkäpavun siemen sisälsi puolestaan taas hieman enemmän raakavalkuaista (310 g/kg ka) kuin rehutaulukoissa on ilmoitettu (300 g/kg ka). Tässä kokeessa käytetyn Spirulina-levän raakavalkuaispitoisuus (683 g/kg ka) poikkesi Beckerin (2007) arviosta (460–630 g/kg ka). Kuitenkin Panjaitan ym. (2015) kokeessa Spirulinan raakavalkuaispitoisuus oli 714 g/kg ka, Ylisen (2015) kokeessa 687 g/kg ka ja Lammisen ym. (2016) kokeessa 697 g/kg ka. Mikrolevien raakavalkuaispitoisuutta kuitenkin usein suurentaa niiden sisältämä suuri ei-proteiini-typen määrä. Lisäksi mikrolevien valkuaisen sulavuutta ja pötsihajoavuutta ei tunneta. Tässä kokeessa käytetyn Spirulina-levän valkuaisen välttämättömien aminohappojen pitoisuudet tryptofaanin pitoisuutta lukuun ottamatta olivat jonkin verran pienemmät kuin kirjallisuudessa

(Becker 2007) on ilmoitettu. Kuitenkin levien kasvatusolosuhteet voivat vaikuttaa merkittävästi niiden koostumukseen (Mata ym. 2010).

Lehmät söivät hyvin seosrehua, keskimäärin 23,1 kg ka/pv. Huhtasen ym. (2011) meta-analyysin mukaan rypsin on todettu lisäävän säilörehun syöntiä ja kokonaisyöntiä jopa enemmän kuin soijan. Rypsiruoikinnassa ja härkäpapuruoikinnassa lypsylehmien kuiva-aineen syönnissä ei ollut eroja. Härkäpapu ei ole vaikuttanut syöntiin muissakaan tutkimuksissa, kun sitä verrattiin soijaan (Volpelli ym. 2010, Tufarelli ym. 2012) tai rypsiin (Puhakka ym. 2014). Hypoteesin mukaisesti tässä tutkimuksessa Spirulina vähensi syöntiä keskimäärin 0,6 kg ka/pv, kun sillä korvattiin osittain rypsirouhetta ja härkäpapua. Käytössä oli seosrehuruokinta, jolloin arveltiin Spirulinan maun ja/tai hajun sekoittuvan muiden rehujen joukkoon. Kuitenkaan Ylisen (2015) kokeessa Spirulina-levän ja Chlorella-levän seos ei vähentänyt syöntiä erillisruoikinnassa edes silloin, kun rypsi korvattiin täysin mikroleväseoksella. Halmemies-Beauchet-Filleaun ym. (2016) kokeessa erillisruoikinnassa Spirulina vähensi väkirehun syöntiä rypsiin verrattuna, mutta ei vaikuttanut kokonaisyöntiin, sillä lehmät söivät säilörehua enemmän leväruokinnoissa.

Eri mikrolevälajeissa on eroja maittavuuden suhteen. Halmemies-Beauchet-Filleaun ym. (2016) kokeessa maittavuus oli heikointa *Nannochloropsis gaditana*n ja *Chlorella vulgariksen* seosta (0,85 + 0,85 kg/pv) sisältävässä ruoikinnassa, kun kokeessa olivat mukana myös Spirulina (1,2 kg/pv)- ja Chlorella-mikrolevät (1,4 kg/pv). Maidon rasvahappopitoisuuksiin keskittyneissä kokeissa levien antotasot ovat olleet pieniä. Esimerkiksi Kulpyksen ym. (2009) kokeessa Spirulinaa annettiin vain 0,20 kg ka/pv, eikä syöntiä mitattu. Tässä kokeessa Spirulinan saanti oli noin 0,67 kg/pv. Näin ollen tarvitaan vielä lisätutkimusta vastaavilla suurilla annos-  
tasoilla maittavuuteen liittyen.

Monityydyttymättömät rasvahapot ovat myrkyllisiä pötsin kuitua sulattaville mikrobeille, ja suuri monityydyttymättömien rasvahappojen määrä ruoikinnassa voi vähentää syöntiä (McDonald ym. 2011). Tässä kokeessa ei tutkittu rehujen rasva-



happokoostumusta, mutta Ylisen (2015) kokeessa käytetty Spirulina-levä sisälsi monityydyttymättömiä rasvahappoja 46 g/100 g rasvahappoja. Samassa kokeessa käytetty rypsi sisälsi monityydyttymättömiä rasvahappoja vain hieman vähemmän (35 g/100g rasvahappoja). Kuitenkin rypsi ja Spirulina sisältävät yhtä paljon raakasvaa, mutta rypsin syöttömäärät ovat suuremmat. Esimerkiksi tässä kokeessa rypsi-Spirulina – ruokinnassa lehmät söivät rypsiä keskimäärin 1,3 kg/pv ja Spirulinaa noin 0,67 kg/pv. Näin ollen monityydyttymättömien rasvahappojen määrä ei selitä vähentyntä syöntiä Spirulina-ruokinnoissa.

## 6.2 Maitotuotos ja maidon koostumus

Hypoteesin mukaisesti rypsiruoкинnoissa maitotuotos oli härkäpapuruokintoja suurempi. Rypsin aminohappokoostumus vastaa todennäköisesti paremmin lypsylehmän tarvetta. Lisäksi rypsin pötsissä hajoavan valkuaisen osuus on pienempi kuin härkäpavun (Luke 2015). Rypsin on useissa tutkimuksissa todettu olevan tuotostasteeltaan jopa soijaa parempi valkuaisrehu niin nurmisäilörehuruokinnassa kuin apilasäilörehuruokinnassakin (Rinne ym. 2006, Huhtanen ym. 2011). Rypsin parempaa maidontuotantovaikutusta selittää osittain se, että rypsi lisää kokonaisyöntiä ja näin ollen lisää energian saantia (Huhtanen ym. 2011).

Volpellin ym. (2010) ja Tufarellin ym. (2012) tutkimuksissa härkäpapu ei pienentänyt maitotuotosta, kun sitä verrattiin soijarouheeseen. On kuitenkin huomattava, että Volpellin ym. (2010) kokeessa lehmät lypsivät vain 20–22 kg/pv, ja Tufarellin ym. (2012) kokeessa 27 kg/pv. Kokeissa lehmien tuotostaso on siis ollut pienempi kuin tässä kokeessa, jossa lehmät lypsivät n. 30 kg/pv. Härkäpapu siis saattaa riittää täyttämään lypsylehmän valkuaisen tarpeen tuotostason ollessa matala. Puhakan ym. (2014) tutkimuksessa rypsin maitotuotostaste oli pienempi kuin aiemmissa tutkimuksissa, jolloin härkäpapu sai aikaan rypsirouhetta paremman maitotuotostasteen. Kuten palkoviljojenkin kohdalla (Cros ym. 1991), myös rypsin pötsissä hajoavan valkuaisen osuutta on pyritty vähentämään erilaisten käsittelyiden avulla. Tässä tutkimuksessa käytetty kaupallinen rypsirouhe oli lämpökäsitelty,

mikä voi ainakin osittain selittää härkävavun ja rypsin tuotoseroa. Huhtasen ym. (2011) meta-analyysin mukaan lämpökäsitellyn rypsirouheen tuotantovaikutus ei kuitenkaan eronnut ei-käsitellyn rypsin tuotantovaikutuksesta.

Maidon rasva- ja valkuaispitoisuudet olivat suuret, mitä selittänee säilörehun hyvä sulavuus ja näin ollen hyvä energian saanti. Rypsin korvaaminen täysin härkävavulla ei vaikuttanut maidon pitoisuuksiin. Kuitenkin maidon rasva- ja valkuaispitoisuudet olivat suuremmat lehmien saadessa rypsin ja Spirulinan yhdistelmää kuin pelkkää rypsiä, mikä saattaa osin selittyä konsentroitumisella maitotuotoksen pienentyessä. Spirulina-ruokinnoissa ohran määrä oli myös suurempi, jolloin myös tärkkelyksen ja näin ollen myös energian saanti mahdollisesti lisääntyivät. Härkävavun ja Spirulinan yhdistelmällä maidon rasva- ja valkuaispitoisuudet puolestaan olivat pienemmät kuin pelkällä härkävavuruokinnalla, mikä voi osittain selittyä laimenemisellä maitotuotoksen samanaikaisesti lisääntyessä.

Rypsiroukinnoissa valkuais- ja laktoosituotokset sekä suuntaa-antavasti myös rasvatuotos olivat suuremmat kuin härkävavuruokinnoissa. Rypsiroukinnassa myös ohutsuolet imeytyvän valkuaisen määrä oli härkävavuruokintoja suurempi, mikä yhdessä parantuneen tuotoksen kanssa kertoo paremmasta energian ja valkuaisen hyväksikäytöstä maidontuotantoon rypsi- kuin härkävavuruokinnoissa, sillä energian ja valkuaisen saannissa ei ollut eroa ruokintojen välillä. Korvatessaan rypsiä Spirulina vähensi maito- ja valkuaisuutosta verrattuna puhtaaseen rypsiin, mikä selittynee syönnin ja täten energian saannin vähenemisellä. Korvatessaan härkävavua Spirulina lisäsi maito- ja valkuaisuutosta verrattuna puhtaaseen härkävavupuun, mikä kertoo Spirulinan täydentäneen härkävavun valkuaista. Eicherin (2004) mukaan maidon rasva-valkuaisuutteen tulisi olla välillä 1,1–1,4. Tätä alempi suhde voi altistaa happamalle pötsille, kun lehmä saa liikaa väkirehua suhteessa karkearehun määrään. Rasva-valkuaisuutteen ylittäessä 1,4, voi vaarana olla energiavaje. Tässä kokeessa rasva-valkuaisuusvaihteli 1,30–1,33 välillä, mikä on tavoitealueella.

Maidon ureapitoisuus oli suurempi härkäpapuruokinnassa kuin rypsiaruokinnassa. Maidon ureapitoisuuden on todettu korreloivan lypsylehmän valkuaisen hyväksikäytön kanssa (Hof ym. 1997). Maidon suuri ureapitoisuus viittaa pötsin suureen ammoniakkipitoisuuteen (McDonald ym. 2011), ja näin ollen rehun valkuaisen huonompaan hyväksikäyttöön maitovalkuaiseksi (Hof ym. 1997). Maidon pieni ureapitoisuus kertoo siis valkuaisen puutteesta (Kulpys ym. 2009). Tässä kokeessa maidon ureapitoisuus vaihteli 27,0–30,2 mg/dl. Mikäli maidon ureapitoisuus on alle 17–18 mg/dl, valkuaisesta on todennäköisesti puutetta (Luke 2015). Suurella maidon ureapitoisuudella on epäilty olevan negatiivisia vaikutuksia myös lehmien hedelmällisyyteen, mutta Goddenin ym. (2001) mukaan ureapitoisuuden vaikutus hedelmällisyyteen olisi erittäin pieni. Maidon ureapitoisuus oli suurempi härkäpapuruokinnassa rypsiaruokintaan verrattuna myös Puhakan ym. (2014) tutkimuksessa. Toisaalta soijaruuhoeseen verrattuna maidon ureapitoisuus on vähentynyt härkäpapuruokinnassa (Volpelli ym. 2010, Tufarelli ym. 2012). Näissä kokeissa härkäpapua oli käsitelty voimakkaammin, mikä on saattanut vähentää härkäpavun pötsissä hajoavan valkuaisen osuutta ja näin ollen parantaa härkäpavun valkuaisen hyväksikäyttöä maidontuotantoon.

Mikrolevä tasoitti maidon ureapitoisuuksien eroja. Kun rypsiä korvattiin osittain Spirulinalla, maidon ureapitoisuus suureni, mutta kun härkäpapua korvattiin osittain Spirulinalla, ureapitoisuus pieneni. Härkäpapu ja Spirulina-levä täydensivät luultavasti aminohappokoostumukseltaan toisiaan. Kulpyksen ym. (2007) kokeessa Spirulinalla ei ollut vaikutusta maidon ureapitoisuuteen, mutta Ylisen (2015) kokeessa maidon ureapitoisuus oli pienin, kun mikroleväseos korvasi puolet rypsin valkuaisesta. Ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä. Rehun hyväksikäyttö maidontuotantoon oli puhtaassa härkäpapuruokinnassa rypsiaruokintoja heikompi, mikä myös kertoo härkäpavun epätasapainoisemmasta aminohappokoostumuksesta. Kun Spirulina-levä korvasi osittain härkäpapua, ei rehun hyväksikäytön suhteen ollut eroa rypsiaruokintoihin verrattuna.

### 6.3 Plasman aminohapot sekä maitorauhasen aminohappometabolia

Tässä kokeessa valtimoveren välttämättömien aminohappojen kokonaismäärä sekä välttämättömien aminohappojen pitoisuudet treoniinia lukuun ottamatta olivat suuremmat rypsirokuokkinnoissa kuin härkäpapuruokkinnoissa. Toisaalta sekä arginiinin että lysiinin saanti (g/pv) olivat suuremmat härkäpapuruokkinnoissa kuin rypsirokuokkinnoissa eikä välttämättömien aminohappojen kokonaissaannissa ollut suurta eroa rypsin hyväksi (172 vs. 166 g/pv). Härkäpavun raakavalkuaisesta suurempi osa hajoaa kuitenkin jo pötsissä, jolloin ohitusvalkuaisen osuus on pienempi kuin rypsin valkuaisessa.

Optimoimalla dieetin aminohappokoostumus vastaamaan hyvin lypsylehmän aminohappojen tarvetta voidaan pienentää typen eritystä ympäristöön. Jos tuotantoa rajoittaa vain yksi aminohappo, mutta kaikkia muita aminohappoja tulee yli tarpeen, eritetään ylimääräisten aminohappojen sisältämä typpi virtsan ureana. Tuotantoa rajoittavia aminohappoja on selvitetty infusoimalla yksittäisiä aminohappoja ruoansulatuskanavaan. Vanhatalon ym. (1999) kokeessa kontrolliryhmän valtimoplasman histidiinipitoisuus oli 18  $\mu\text{mol/l}$ , kun kontrolliryhmä sai nurmisäilörehua ja väkirehua (ohra, kaura, melassi, kivennäinen) ilman valkuaislisää. Kun juokutusmahaan infusoitiin 6,5 g histidiiniä, valtimoplasman histidiinipitoisuus suureni tasolle 53  $\mu\text{mol/l}$ . Histidiinin saanti lisäsi maitotuotosta ja oli näin ollen ensimmäinen maidontuotantoa rajoittava aminohappo nurmiheinäsäilörehuun ja viljaan pohjautuvassa ruokinnassa. Samassa tutkimuksessa infusoitiin myös metioniinia ja lysiiniä, mutta niistä kumpikaan ei osoittautunut toiseksi rajoittavaksi aminohapoksi. Myöskään isoleusiini, leusiini tai valiini ei ole ollut maidontuotantoa toiseksi rajoittava aminohappo nurmisäilörehuun ja viljaan pohjautuvassa ruokinnassa (Korhonen ym. 2002). Eri kokeissa on saatu vaihtelevia tuloksia siitä, mikä olisi toinen tuotantoa rajoittava aminohappo, ja myös glukoosin osuutta on tutkittu. Robinson (2010) on esittänyt, että metioniini ja lysiini voisivat olla maidontuotantoa ensiksi rajoittavia aminohappoja. Korhosen (2003) mukaan amino-

happojen tarve ei vaikuta olevan pysyvä, vaan myös säilörehun laatu selittää sitä, mikä sillä hetkellä on rajoittava aminohappo.

Korhosen ym. (2003) mukaan plasman histidiinipitoisuus lisääntyy herkästi, kun histidiinin saantia lisätään. Kun plasman histidiinipitoisuus on ylittänyt 37  $\mu\text{mol/l}$ , maito- ja valkuaisuotokset eivät ole enää lisääntyneet (Kim ym. 2001). Tässä tutkimuksessa valtimon histidiinipitoisuudet olivat rypsi-ruokinnassa 37–39 ja härkäpapuruokinnassa 32–33  $\mu\text{mol/l}$ . Koeryhmistä numeerisesti suurin veren histidiinipitoisuus oli rypsi-Spirulina -ruokinnassa, kun taas härkäpavu-ruokinnassa histidiinipitoisuus oli kauttaaltaan pieni, vaikka härkäpavun valkuaisen histidiinipitoisuus oli jopa hieman suurempi kuin rypsin valkuaisen. Kun Spirulinan valkuainen korvasi härkäpavun ja rypsin valkuaista, Spirulinalla ei ollut vaikutusta plasman histidiinipitoisuuksiin tai maitorauhasen histidiinin ottoon. Spirulinan valkuaisen pieni histidiinipitoisuus ei siis tässä tutkimuksessa todennäköisesti rajoittanut tuotantoa.

Aiemmin mikrolevien vaikutusta plasman aminohappoihin ja maitorauhasen aminohappometaboliaan on tutkittu vain Ylisen (2015) ja Lammisen ym. (2016) kokeissa. Ylisen (2015) tutkimuksessa plasman histidiinipitoisuus pieneni suoravii-  
vaisesti, kun rypsiä korvattiin Spirulina- ja Chlorella-mikrolevien seoksella. Kuitenkin plasman histidiinipitoisuus kokeessa oli tasolla 50,5 – 56,5  $\mu\text{mol/l}$ , joten histidiini ei luultavasti rajoittanut maidontuotantoa. Lamminen ym. (2016) tutki-  
vat kahdessa eri kokeessa välttämättömien aminohappojen metaboliaa. Ensimmäi-  
sessä kokeessa valtimoveren histidiinipitoisuus ja maitorauhasen histidiinin otto  
pienenivät, kun Spirulina korvasi dieetissä rypsirouhetta. Kuitenkaan toisessa ko-  
keessa eri mikrolevillä ei ollut vaikutusta aminohappojen pitoisuuksiin soija-  
rouheeseen tai toisiinsa verrattuna. Muista välttämättömistä aminohapoista Ylisen  
(2015) kokeessa maitorauhanen otti suuntaa-antavasti enemmän isoleusiinia, kun  
mikrolevät korvasivat rypsiä.

Valtimo-laskimo – erotuksen avulla voidaan arvioida maitorauhasen ottamaa ravintoaineiden määrää (Fleet ja Mephram 1983). Veri kuljettaa useita eri ravintoaineita, ja kun vähennetään valtimoveressä maitorauhaseen tulleiden aminohappojen pitoisuuksista ( $\mu\text{mol/l}$ ) laskimovereen jääneiden aminohappojen pitoisuudet ( $\mu\text{mol/l}$ ), saadaan selville maitorauhaseen otettujen aminohappojen pitoisuudet. Verinäytteet otettiin tässä kokeessa maitosuonesta, josta saatiin laskimoveren pitoisuudet ja häntäsuonesta, josta saatiin valtimoveren pitoisuudet. Arginiinin, fenyylialaniinin, histidiinin, leusiinin, ja valiinin AV-erotukset olivat suuremmat rypsi-erokannoissa kuin härkäpapuruokannoissa. Kun härkäpapua korvattiin osittain Spirulinan valkuaisella, kyseisten aminohappojen AV-erotukset lisääntyivät histidiiniä lukuun ottamatta. Härkäpavun ja Spirulinan valkuainen siis täydensivät toisiaan, mutta histidiinin AV-erotus oli edelleen suurin rypsi-erokannassa.

Rypsi-erokannoissa maitorauhanen otti enemmän metioniinia, fenyylialaniinia ja histidiiniä kuin härkäpapuruokannoissa, kun mitattiin maitorauhasen ottamien aminohappojen määrää ( $\text{mmol/pv}$ ). Rypsin ja härkäpavun korvaaminen Spirulinalla vähensi entisestään maitorauhasen metioniinin ottoa. Maitorauhasen metioniinin otto-% suureni Spirulinan korvatessa härkäpapua, mutta otto-% pieneni Spirulinan korvatessa rypsiä. Plasman metioniinipitoisuudet olivat tässä kokeessa rypsi-erokannoissa 23–24 ja härkäpapuruokannoissa 21  $\mu\text{mol/l}$ . Vanhatalon ym. (1999) tutkimuksessa kontrolliruokinnan plasman metioniinipitoisuus oli 21  $\mu\text{mol/l}$ . Kun metioniinia infusoitiin juokutusmahaan yhdessä histidiinin kanssa, plasman metioniinipitoisuus nousi tasolle 33  $\mu\text{mol/l}$ . Metioniinin infuusiolla ei kuitenkaan ollut vaikutusta maitotuotokseen. Toisaalta Pisulewskin ym. (1996) kokeessa maidon valkuaispitoisuus ja -tuotos lisääntyivät lineaarisesti, kun plasman metioniinipitoisuus suureni pitoisuudesta 15  $\mu\text{mol/l}$  pitoisuuteen 37  $\mu\text{mol/l}$ . Näin ollen härkäpavun valkuaisen pieni metioniinipitoisuus saattoi siis rajoittaa maidon ja valkuaisen synteesiä tässä kokeessa. Härkäpavu-Spirulina – ruokinnassa maitorauhanen myös otti plasmasta vähemmän metioniinia kuin pelkässä härkäpapuruokinnassa.

## 6.4 Typpitase ja typen jakautuminen

Typpitase oli kaikissa ruokinnoissa positiivinen eli lehmät saivat enemmän typpeä, kuin mitä ne erittivät maitoon, virtsaan ja sontaan. Tässä kokeessa valkuaisruokinnat olivat isonitrogeenisia, eikä raakavalkuaisen saanti eronnut eri koeruokinnoissa. Castellon ym. (2001) mukaan suurin osa tpeestä eritetään sonnassa, kun ruokinnan raakavalkuaispitoisuus on pieni. Ruokinnan raakavalkuaispitoisuuden lisääntyessä virtsassa eritetyn typen määrä lisääntyy. Virtsassa voidaan erittää jopa 70 % kaikesta eritetystä tpeestä. Näin ollen virtsan typen erityksen vähentäminen on tärkeintä ja helpointa ruokinnallisoin keinoin. Nousiaisen ym. (2003) mukaan typen eritystä virtsassa voitaisiin vähentää vähentämällä valkuaisrehujen käyttöä ja suosimalla rehuja, joissa on vain vähän pötsissä hajoavaa valkuaista.

Härkäpapuruokinnoissa typpeä erittyi (g/pv) vähemmän maidossa ja sonnassa kuin rypsirokinnoissa. Typen sulavuus oli siis heikompaa rypsirokinnoissa kuin härkäpapuruokinnoissa. Lammisen ym. (2016) kokeessa rypsin korvaaminen Spirulinalla lisäsi typen eritystä virtsaan (+6,3 prosenttiyksikköä) ja vähensi typen eritystä maitoon (-1,7 prosenttiyksikköä). Myös tässä kokeessa Spirulina lisäsi suuntaa-antavasti typen eritystä virtsaan. Tulosta voi selittää pienempi typpitase Spirulina-ruokinnoissa, jolloin typpeä pidättyi vähemmän kuin härkäpavu- ja rypsirokinnoissa. Rypsirokinnaan verrattuna tulosta voi selittää myös Spirulinan valkuaisen mahdollisesti rypsiä suurempi pötsihajoavuus. Tähän viittaa pötsinesteen suurempi ammoniakkipitoisuus Spirulinan korvatessa rypsiä. Myös spot-virtsanäytteiden epäedustavuus on voinut vaikuttaa tulokseen.

Rehutypen hyväksikäyttö maitovalkuaiseksi oli tässä kokeessa 27–29 %. Typen hyväksikäyttö maidontuotantoon ei Huhtasen ym. (2015) meta-analyysin mukaan riipu juurikaan maitotuotoksesta. Merkittävimmät tekijät ovat rehuannoksen raakavalkuaispitoisuus ja pötsin valkuaispitoisuus. Puhakan ym. (2014) kokeessa maidon ureapitoisuus lisääntyi, kun rypsin ja härkäpavun syötettävää annosta lisättiin. Typen hyväksikäyttö maidontuotantoon oli Bliznikasin ym. (2004) kokeessa

pienempi härkäpapuruokinnassa (24 %), kuin lupiiniruokinnassa (27 %) ja soijapapuruokinnassa (27 %). Nousiaisen ym. (2003) meta-analyysin mukaan typen hyväksikäyttö maidontuotantoon oli keskimäärin 28,1 %. Pääosin Suomesta kerätty aineisto koostui 55 kokeesta ja 334 ruokinnasta. Näin ollen tässä kokeessa rehutypen hyväksikäyttö maidontuotantoon oli tavanomaisella tasolla ruokintojen raakavalkuaispitoisuuksien ollessa 165–170 g/kg ka.

Walkerin ym. (2005) mukaan ammoniakkia tulee pötsiin peptidien ja aminohappojen hajoamisesta, NPN – yhdisteistä, alkueläinten aineenvaihdunnasta sekä ilma-kehän tyyppistä. Ammoniakkia poistuu pötsistä sitoutumalla mikrobivalkuaiseksi ja siirtymällä pötsin seinämän läpi verenkiertoon sekä osa jatkaa kulkua ohutsuoleen. Schwab ym. (2005) arvioivat useiden tutkimusten pohjalta pötsinesteen sopivaa ammoniakkipitoisuutta. Heidän mukaansa pötsinesteen ammoniakkipitoisuuden ollessa 1,6-6 mmol/l pötsissä on riittävästi tyyppiä mikrobi-proteiinisynteesin lähtöaineeksi. Jos pötsin ammoniakkipitoisuus on pieni, on pötsimikrobeilla pulaa pötsissä hajoavasta valkuaisesta. Mikäli pötsinesteen ammoniakkipitoisuus ylittää 5 mmol/l, pötsissä valkuaisen hajoaminen on nopeampaa kuin valkuais-synteesi, ja pötsissä tapahtuu tyypitappioita. Tässä kokeessa pötsinesteen ammoniakkipitoisuus oli 6,12–9,37 mmol/l ja pötsin valkuais-tase oli reilusti positiivinen (602-762 g/pv), joten pötsimikrobeilla ei ollut pulaa pötsissä hajoavasta valkuaisesta. Härkäpapuruokinnoissa pötsin ammoniakkipitoisuus ja pötsin valkuais-tase olivat rypsi-ruokintoja suuremmat. Härkäpavun valkuaisesta suuri osa on siis jo hajonnut pötsissä, mutta pötsimikrobeilla ei ole ollut tarpeeksi energiaa valmistaa mikrobivalkuaista riittävään tahtiin. Tällöin pötsinesteeseen kertynyt ammoniakki kulkeutuu verenkierron mukana maksaan, jossa siitä muodostuu ureaa, joka eritetään virtsaan. Näin ollen myös maidon ureapitoisuus oli suurempi härkäpapuruokinnoissa kuin rypsi-ruokinnoissa.

Bliznikasin ym. (2004) vertasivat härkäpavun ja valkolupiinin siemeniä valkuais-rehuna soijarouheeseen. Kokeen väkirehutaso oli keskimäärin vain 4,88 kg/pv. Myös tässä kokeessa pötsin ammoniakkipitoisuus oli suurempi härkäpapuruokin-



nassa kuin valkolupiini- tai soijaruokinnassa. Pötsin suuremman ammoniakkipitoisuuden arveltiin johtuvan härkäpavun suuremmasta pötsihajoavuudesta. Lammisen ym. (2016) kokeessa pötsin ammoniakkipitoisuus suureni 0,56 mmol/l, kun Spirulina korvasi täysin rypsin. Spirulinan valkuaisen pötsihajoavuutta ei tunneta, mutta tämän kokeen ja Lammisen ym. (2016) kokeen tulosten perusteella sen voisi arvioida olevan suurempi kuin rypsin hajoavuuden, mutta pienempi kuin härkäpavun. Pötsin mikrobitypen tuotanto lisääntyi lähes suuntaa-antavasti Spirulinan korvatessa rypsiä ja härkäpapua. Mikrobitypen tuotantoa on voinut lisätä Spirulina-ruokintojen suurempi ohran osuus ja näin ollen suurempi energian määrä. Härkäpapu sisältää myös runsaasti tärkkelystä, mutta härkäpavun tärkkelyksen ja ohran tärkkelyksen pötsihajoavuudessa saattaa olla eroja. Larsenin ym. (2009) mukaan palkokasvien tärkkelyksen sulavuus on heikompi kuin viljojen tärkkelyksen sulavuus, mikä on voinut selittää suurempaa mikrobitypen tuotantoa Spirulina-ruokinnoissa.

## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Lämpökäsitellyn rypsirouheen korvaaminen jauhetulla härkäpavulla vähensi maitotuotosta 1,4 kg/pv. Myös rasva-, valkuais- ja laktoosituotokset olivat pienemmät härkäpavu- kuin rypsiroukinnoissa. Härkäpavun siemen ei siis ole rypsin veroinen valkuaisrehu sen valkuaisen pienen metioniinipitoisuuden ja suuren pötsihajoavuuden vuoksi. Rehuvalkuaisen hyväksikäyttö maitovalkuaiseksi oli huonompi härkäpapuruokinnoissa verrattuna rypsiroukintoihin, mistä on osoituksena maidon suurempi ureapitoisuus sekä pötsinesteen suurempi ammoniakkipitoisuus härkäpapuruokinnoissa.

Mikrolevät ovat uusi valkuaisenlähde kotieläimillä. Spirulina-mikrolevä ruokinassa vähensi kuiva-aineen syöntiä 0,6 kg/pv. Korvatessaan rypsin valkuaista Spirulina vähensi maito-, valkuais- ja laktoosituotosta, mutta lisäsi niitä härkäpavua korvatessaan. Spirulina ei kuitenkaan vaikuttanut energiakorjatun maidon määrään. Spirulina-levän valkuainen ja härkäpavun valkuainen todennäköisesti täydensivät toisiaan, mikä näkyi suurentuneena maitorauhasen välttämättömien aminohappojen AV-erotuksena ja maidon pienempänä ureapitoisuutena. Tässä tutkimuksessa levävalkuaisen pieni histidiinipitoisuus ei rajoittanut tuotosta. Mikrolevistä tarvittaisiin lisää tutkimusta vastaavilla suurilla annostasoilla.

## **KIITOKSET**

Haluan lämpimästi kiittää maisterintutkielmani ohjaajia tutkijatohtori Anni Hallemies-Beauchet-Filleau'ta sekä yliopistonlehtori Seija Jaakkolaa avusta tämän tutkielman parissa. Teiltä sai ja uskalsi kysyä apua, ja vastaukset tulivat nopeasti. Haluan kiittää myös tohtorikoulutettava Marjukka Lammista sekä Viikin opetus- ja tutkimustilan henkilökuntaa kaikesta avusta ruokintakokeen parissa.

Kiitos Heli, Sonja, Heini ja Tiina - teidän kanssa opiskeluaika oli niin paljon helpompaa ja mukavampaa. Erityiskiitos vertaistuesta Helille, joka jakoi aina lähteä yhdessä kirjastoon ja gradustipendin turvin jopa Kilpisjärvelle asti omaa graduaan työstämään. Kiitokset myös Hannulle, äidille, isälle, Lauralle ja muille ystäville kaikesta avusta ja kannustavasta asenteesta opintoihin.

## LÄHTEET

- Antikainen, R., Lemola R., Nousiainen, J.I., Sokka, L., Esala M., Huhtanen P. & Rekolainen S. 2005. Stocks and flows of nitrogen and phosphorus in the Finnish food production and consumption system. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 107: 287-305.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis, 16<sup>th</sup> edition. Association of official analytic chemists, Arlington, VA, USA.
- Barker, S. B. & Summerson, W. H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological materials. *The Journal of Biological Chemistry* 138: 537-554.
- Becker, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25: 207-210.
- Bliznikas, S., Tarvydas, V. & Uchockis, V. 2004. Efficiency of sweet lupin and faba bean seeds in diets for lactating dairy cows. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture* 12(307): 41-46.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespén, T., Van Straalen, W. & Fievez, V. 2008. Effect of Dietary Starch or Micro Algae Supplementation on Rumen Fermentation and Milk Fatty Acid Composition of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 91: 4714-4727.
- Cant, J. P., DePeters, E. J. & Baldwin, R. L. 1993. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *Journal of Dairy Science* 76: 762-774.
- Castillo, A. R., Kebreab, E., Beever, D. E., Barbi, J. H., Sutton, J. D., Kirby, H., C. & France, J. 2001. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *Journal of Animal Science* 79: 247-253.
- Chen, X. B. & Gomez, M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary extraction of purine derivatives – an overview of the technical details. International Feed Resources Unit. Rowett Research Institute, Aberdeen, Iso-Britannia.
- Crépon, K., Marget, P., Peyronnet, C., Carrouée, B., Arese, P. & Duc, G. 2010. Nutritional value of faba bean (*Vicia Faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research* 115: 329-339.
- Cros, P., Vernay, M. & Moncoulon, R. 1991. In situ evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole horse beans. *Reproduction Nutrition Development* 31: 249-255.
- Drewery, M. L. 2012. Post-extraction algal residue as a protein source for cattle consuming forage. *Kotieläintieteen pro gradu –tutkielma*. Texas A & M University. 107 s.

- Eicher, R. 2004. Evaluation of the metabolic and nutritional situation in dairy herds: Diagnostic use of milk components. Proceedings of the WBC Congress, Québec, Canada, 2004.
- European Commission. 1998. Commission Directive 98/64/EC. Community methods of analysis for the determination of amino acids, crude oils and fats, and olaquinox in feeding stuffs and amending directive 71/393/EEC. In: Off. J. European Communities L 257. s. 4–23.
- Fleet, I. R. & Mepham, T. B. 1983. Physiological methods used in the study of mammary substrate utilization in ruminants. Teoksessa *Biochemistry of Lactation*. Toim. Mepham, T. B. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Hollanti. 469 s.
- Friedel, K. 1990. Die Schätzung des energetischen Futterwertes von Grobfutter mit Hilfe einer Cellulasemethode. [The estimation of the energetic feeding value of roughages by means of a cellulose method]. *Wissenschaftliche Zeitung Universität Rostock, N-Reihe* 39, 78-86.
- Gatta, D., Russo, C., Giuliotti, L., Mannari, C., Picciarelli, P., Lombardi, L., Giovannini, L., Ceccarelli, N. & Mariotti, L. 2013. Influence of partial replacement of soya bean meal by faba beans or peas in heavy pigs diet on meat quality, residual anti-nutritional factors and phytoestrogen content. *Archives of Animal Nutrition* 67(3): 235-247.
- George, S. K., Dipu, M. T., Mehra, U. R., Singh, P., Verma, A. K. & Ramgaokar, J. S. 2006. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. *Journal of Chromatography B* 832: 134-137.
- Godden, S. M., Kelton, D. F., Lissemore, K. D., Walton, J. S., Leslie, K. E. & Lumsden, J. H. 2001. Milk Urea Testing as a Tool to Monitor Reproductive Performance in Ontario Dairy Herds. *Journal of Dairy Science* 84:1397–1406.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kairenius, P., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Huhtanen, P., Vanhatalo, A., Givens, D. I. & Shingfield, K.J. 2013b. Effect of forage conservation method on plasma lipids, mammary lipogenesis, and milk fatty acid composition in lactating cows fed diets containing a 60:40 forage-to-concentrate ratio. *Journal of Dairy Science* 96: 5267–5289.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Lamminen, M., Kokkonen, T., Jaakkola, S. & Vanhatalo, A. 2016. Mikrolevät lypsylehmien ruokinnassa: 1. Maidontuotanto. Julkaisussa: *Maataloustieteen Päivät 2016*. Suomen Maataloustieteellisen seuran julkaisu no 32. Toim. Laura Alakukku, Nina Schulman ja Tuula Puhakainen. ISBN 978-951-9041-61-2.
- Hof, G., Vervoorn, D., Lenaers, P. J. & Tamminga, S. 1997. Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80: 3333-3340.

- Holman, B. W. B. & Malau-Aduli, A. E. O. 2012. Spirulina as a livestock supplement and animal feed. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 615-623.
- Huhtanen, P., Cabezas-Garcia, E. H., Krizsan, S. J. & Shingfield, K. J. 2015. Evaluation of between-cow variation in milk urea and rumen ammonia nitrogen concentrations and the association with nitrogen utilization and diet digestibility in lactating cows. *Journal of Animal Science* 5(98): 3182–3196.
- Huhtanen, P., Hetta, M. & Swensson, C. 2011. Evaluation of canola meal as a protein supplement for dairy cows: A review & meta-analysis. *Canadian Journal of Animal Science* 91: 529–543.
- Huhtanen, P., Nousiainen, J. & Rinne, M. 2006. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agricultural and Food Science* 15: 293–323.
- Huhtanen, P., Rinne, M. & Nousiainen, J. 2007. Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. *Animal* 1(5): 758–770.
- Huida, L., Väätäinen, H., Lampila, M. 1986. Comparison of dry matter contents in grass silages as determined by oven drying and gas chromatographic water analysis. *Annales Agriculturae Fenniae* 25: 215–230.
- Kim, C.-H., Choung, J.-J. & Chamberlain, D. G. 2001. Estimates of the efficiency of transfer of L-histidine from blood to milk when it is the first-limiting amino acid for secretion of milk protein in the dairy cow. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 1150-1155.
- Koivunen, E., Jaakkola, S., Heikkilä, T., Lampi, A.M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Lee, M. R. F., Winters, A.L., Shingfield, K.J. & Vanhatalo, A. 2015. Effects of plant species, stage of maturity, and level of formic acid addition on lipolysis, lipid content, and fatty acid composition during ensiling. *Journal of Animal Science* 93: 4408–4423.
- Korhonen, M., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., & Huhtanen, P. 2002. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: II. Amino acid profile of microbial fractions. *J. Anim. Sci.* 80:2188-2196.
- Korhonen, M., Vanhatalo, A. & Huhtanen, P. 2002. Effect of protein source on amino acid supply, milk production, and metabolism of plasma nutrients in dairy cows fed grass silage. *Journal of Dairy Science* 85(12): 3 336-3 351.
- Korhonen, M., Vanhatalo, A. & Huhtanen, P. 2002. Evaluation of isoleucine, leucine and valine as a second-limitating amino acid for milk production in dairy cows fed grass silage diet. *Journal of Dairy Science* 85(6): 1 533-1 545.
- Kovač, D.J., Simeunović, J.B., Babić, O.B., Mišan, A.C. & Milovanović, I.L. 2013. Algae in Food and Feed. *Food and Feed Research* 40(1): 21–31.

- Kulpys, J., Paulauskas, E., Pilipavičius, V. & Stankevičius, R. 2009. Influence of cyanobacteria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* biomass additives towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. *Agronomy Research* 7 (2): 823-835.
- Köpke, U. & Nemecek, T. 2010. Ecological services of faba bean. *Fields Crops Research* 3 (115): 217–233.
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Jaakkola, S. & Vanhatalo, A. 2016. Mikrolevät lypsylehmien ruokinnassa: 2. Valkuaisen hyväksikäyttö. Julkaisussa: *Maataloustieteen Päivät 2016*. Suomen Maataloustieteellisen seuran julkaisuja no 32. Toim. Laura Alakukku, Nina Schulman ja Tuula Puuhainen. ISBN 978-951-9041-61-2.
- Larsen, M., Lund, P., Weisbjerg, M. & Hvelplund, T. 2009. Digestion site of starch from cereals and legumes in lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 153: 236-248.
- Lum, K. K., Kim, J. & Lei, X. G. 2013. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4(1):
- Lunkka-Hytönen, M., Lohtander-Buckbee, K. & Ruohonen-Lehto, M. 2013. Biotekniikan neuvottelukunta, Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaus-tutkimus leivistä. BTNK:n julkaisuja 5. <http://www.btnk.fi/>
- Luonnonvarakeskus. 2014. Tilastotietokanta. <http://stat.luke.fi/> Viitattu 16.9.2015.
- Luonnonvarakeskus. 2015. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset [verkkojulkaisu]. Jokioiden: LUKE Luonnonvarakeskus [viitattu 4.11.2015]. Saatavissa: <http://www.mtt.fi/rehutaulukot>.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217–232.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17: 297–304.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. E., Sinclair, L. A. & Wilkinson, R. G. 2011. *Animal Nutrition*. Pearson. 7. painos. 692 s.
- Mordenti, L., Merendi, F., Fustini, M. & Formigoni, A. 2007. Effects of different protein plants in cows diet on milk for Parmigiano Reggiano production. *Italian Journal of Animal Science* 6(1): 463–465.
- Nousiainen, J., Kytölä, K., Khalili, H. & Huhtanen, P. 2003. Ruokinnalliset mahdollisuudet parantaa typen hyväksikäyttöä maidontuotannossa. Teoksessa *Lypsykarjataloudesta tulevan ympäristökuormituksen vähentäminen*. Toim. Uusi-

- Kämppe, J., Yli-Halla, M. & Grék, K. Maa- ja elintarviketalous 25. [www.mtt.fi/met/pdf/met25.pdf](http://www.mtt.fi/met/pdf/met25.pdf).
- Nousiainen, J., Rinne, M., Hellämäki, M. & Huhtanen, P. 2003. Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Animal Feed Science and Technology* 103: 97–111.
- National Research Council (NRC). 1983. Underutilized resources as animal feedstuffs. National Academy Press, Washington D.C., Yhdysvallat. 253 s.
- Paasonen-Kivekäs, M. 2009. Typpi. Teoksessa Maan vesi- ja ravinnetalous – ojitus, kastelu ja ympäristö. Toim. Paasonen-Kivekäs, M., Peltomaa, R., Vakkilainen, P. & Äijö, H. Salaojayhdistys ry. 175-188.
- Panjaitan, T., Quigley, S. P., McLennan, S.R., Swain, A.J. & Poppi, D.P. 2015. Spirulina (*Spirulina platensis*) algae supplementation increases microbial protein production and feed intake and decreases retention time of digesta in the rumen of cattle. *Animal Production Science* 55: 535–543.
- Peltonen-Sainio, P., Hannukkala, A., Huusela-Veistola, E., Voutilainen, L., Niemi, J. & Valaja, J. 2013. Potential and realities of enhancing rapeseed- and grain legume-based protein production in a northern climate. *Journal of Agricultural Science* 151: 303-321.
- Peltonen-Sainio, P. & Niemi, J.K. 2012. Protein crop production at the northern margin of farming: To boost, or not to boost. *Agricultural and Food Science* 21: 370–383.
- Peyraud, J.L. & Astigarraga, L. 1998. Review of the effect of nitrogen fertilisation on the chemical composition, intake, digestion and nutritive value of fresh herbage: consequences on animal nutrition and N balance. *Animal Feed Science and Technology* 72: 235-259.
- Pisulewski, P. M., Rulquin, H., Peyraud, J. L. & Verite, R. 1996. Lactational and systemic responses of dairy cows to postprandial infusions of increasing amounts of methionine. *Journal of dairy science* 79: 1781-1791.
- Puhakka, L., Jaakkola, S., Kokkonen, T. & Vanhatalo, A. 2014. Härkäpapu lypsylehmien valkuaisrehuna. Julkaisussa: Maataloustieteen Päivät 2014. Suomen Maataloustieteellisen seuran julkaisuja no 30. Toim. Mikko Hakojärvi ja Nina Schulman. ISBN 978-951-9041-58-2.
- Puhakka, L., Jaakkola, S. & Vanhatalo, A. 2012. Palkoviljat nautojen ruokinnassa. Julkaisussa: Maataloustieteen Päivät 2012. Suomen Maataloustieteellisen seuran julkaisuja no. x. Toim. Nina Schulman ja Heini Kauppinen. ISBN 978-951-9041-56-8.
- Rinne, M., Jaakkola, S., Varvikko, T. & Huhtanen, P. 1999. Effects of the type and amount of rapeseed feed on milk production. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A Animal Science* 49: 137-148.



- Rinne, M., Kuoppala, K., Ahvenjärvi, S. & Vanhatalo, A. 2006. Rypsi soijaa parempi lypsylehmien valkuaistäydennys myös apilapitoista säilörehua syötettäessä. Julkaisussa: Maataloustieteen Päivät 2006. Suomen Maataloustieteellisen seuran julkaisuja no. 21. Toim. Anneli Hopponen. ISBN 951-9041-49-4.
- Robinson, B. H. 2010. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livestock Science* 127: 115-126.
- Salo, M.-L. 1965. Determination of carbohydrate fractions in animal foods and faeces. *Acta Agraria Fennica* 105: 1-102.
- Sasu-Boakye, Y., Cederberg, C. & Wirsenius, S. 2014. Localising livestock protein feed production and the impact on land use and greenhouse gas emissions. *Animal* 8 (8): 1 339-1 348.
- Schwab, C. G., Huhtanen, P., Hunt, C. W. & Hvelplund, T. 2005. Nitrogen requirements of cattle. Teoksessa *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle*. Toim. Pfeffer, E. & Hristov, A. Oxfordshire, UK: Cabi Publishing. s. 17-20.
- Singh, J. & Saxena, R.C. 2015. An introduction to microalgae: diversity and significance. Teoksessa: Kim, S-K (toim.), *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, USA. s. 11-24.
- Sjaunja, L.O., Baevre, L., Junkarinen, L., Pedersen, J. & Setälä, J. 1990. A Nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. Teoksessa *Performance Recording of Animals: State of the Art- 1990*. Toim. Gaillon, P. & Chabert, Y. PUDOC, Wageningen, Alankomaat: EAAP Publication no. 50: 156-157.
- Stoddard, F.L., Hovinen, S., Kontturi, M., Lindström, K. ja Nykänen, A. 2009. Review: Legumes in Finnish agriculture: history, present status and future prospects. *Agricultural and Food Science* 18: 191-205.
- Tufarelli, V., Khan, R. U. & Laudadio, V. 2012. Evaluating the suitability of field beans as a substitute for soybean meal in early-lactating dairy cow: Production and metabolic responses. *Animal Science Journal* 2 (83): 136-140.
- Tufarelli, V., Lacalandra, G. M. & Laudadio, V. 2015. Reproductive and metabolic responses of early-lactating dairy cows fed different dietary protein sources. *Reproduction in Domestic Animals* 5 (50): 735-739.
- Van Keulen, J. & Young, B. A. 1977. Evaluation of insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science* 44: 282-287.
- Van Krimpen, M. M., Bikker, P., Van der Meer, I. M., Van der Peet-Schwering, C. M. C. & Vereijken, J. M. 2013. Cultivation, processing and nutritional aspects for pigs and poultry of European protein sources as alternatives for imported soyabean products. Wageningen UR Livestock Research. Report 662. <http://edepot.wur.nl/250643>.

- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583–3597.
- Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V. & Varvikko, T. 1999. Response of dairy cows fed grass silage diets to abomasal infusions of histidine alone or in combinations with methionine and lysine. *Journal of Dairy Science* 82 (12): 2674–2685.
- Virtanen, H. & Nousiainen, J. 2005. Nitrogen and phosphorus balances on Finnish dairy farms. *Agricultural and Food Science in Finland* 14 (2): 166–180.
- Vo, T-S., Ngo, D-H. & Kim, S-K. 2015. Nutritional and Pharmaceutical Properties of Microalgal *Spirulina*. Teoksessa: Kim, S-K (toim.), *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, USA. s. 11–24.
- Volpelli, L. A., Comellini, M., Gozzi, M., Masoero, F. & Moschini, M. 2012. Pea (*Pisum sativum*) and faba beans (*Vicia faba*) in dairy cow diet: effect on milk production and quality. *Italian Journal of Animal Science* 11(40): 217–222.
- Volpelli, L. A., Comellini, M., Masoero, F., Moschini, M., Pietro Lo Fiego, D. & Scipioni, R. 2010. Faba beans (*Vicia faba*) in dairy cow diet: effect on milk production and quality. *Italian Journal of Animal Science* 9: 138–144.
- Walker, N. D., Newbold, C.J. & Wallace, R.J. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. Teoksessa: Pfeffer, E. & Hristov, A. (Toim.) *Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle*. Cambridge: CABI Publishing. s. 71–115.
- Ylinen, V. 2015. Mikrolevä lypsylehmien valkuaisrehuna – vaikutus syöntiin, aineenvaihduntaan ja maidontuotantoon. Kotieläinten ravitsemustieteen pro gradu-tutkielma. Helsingin yliopisto, maataloustieteiden laitos. 63 s.
- Ympäristöhallinnon yhteinen verkkopalvelu. 2015. Vesistöjen rakennekuormitus ja luonnon huuhtouma. [http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Kartat\\_ja\\_tilastot/Vesistojen\\_ravinnekuormitus\\_ja\\_luonnon\\_huuhtouma](http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Kartat_ja_tilastot/Vesistojen_ravinnekuormitus_ja_luonnon_huuhtouma). Viitattu 27.10.2015.

## LIITE 1.

Taulukko 11. Maitorauhasen aminohappojen ottoprosentit plasmasta (%).

Aminohapot, %	Koekäsittelyt				SEM	Merkitsevyydet		
	Rypsi	Rypsi <i>+ Spirulina</i>	Härkäpapu	Härkäpapu <i>+ Spirulina</i>		Rypsirouhe vs. härkäpapu	Korvaaminen <i>Spirulinalla</i>	Yhdysvaikutus
Välttämättömät aminohapot, %								
Arginiini	43,8	40,1	38,8	46,0	2,93	0,811	0,398	0,017
Fenyylialaniini	50,8	43,7	43,0	47,0	2,48	0,150	0,320	0,003
Histidiini	41,2	35,8	37,9	38,6	4,32	0,956	0,600	0,505
Isoleusiini	38,3	33,4	35,3	35,4	2,14	0,701	0,108	0,100
Leusiini	52,4	45,4	48,7	49,7	2,05	0,892	0,096	0,026
Lysiini	54,8	51,4	53,9	56,8	2,67	0,295	0,907	0,139
Metioniini	56,4	47,0	51,9	52,7	2,83	0,785	0,063	0,031
Treoniini	29,6	27,6	26,9	29,5	2,32	0,828	0,849	0,138
Tryptofaani	15,7	16,8	16,0	18,3	1,77	0,606	0,319	0,729
Valiini	25,6	23,1	22,4	23,8	1,20	0,205	0,562	0,054
Välttämättömät aminohapot	38,3	34,3	34,1	36,7	1,74	0,418	0,570	0,010
Ei-välttämättömät aminohapot	17,4	15,2	15,0	16,4	1,29	0,557	0,729	0,093
Aminohapot yhteensä	24,9	22,1	20,9	23,1	1,41	0,111	0,742	0,011

Taulukko 12. Maitorauhasen aminohappojen valtimo-laskimo erotus ( $\mu\text{mol/l}$ ).

Aminohapot, $\mu\text{mol/l}$	Koekäsittelyt				SEM	Merkitsevyydet		
	Rypsi	Rypsi + <i>Spirulina</i>	Härkäpapu	Härkäpapu + <i>Spirulina</i>		Rypsirouhe vs. härkäpapu	Korvaaminen <i>Spirulinalla</i>	Yhdysvaikutus
Välttämättömät aminohapot, $\mu\text{mol/l}$								
Arginiini	34,1	29,0	25,6	30,0	2,05	0,011	0,802	0,003
Fenyylialaniini	22,9	19,5	17,5	19,0	1,11	0,005	0,303	0,014
Histidiini	14,1	13,4	9,94	11,5	1,22	0,012	0,704	0,281
Isoleusiini	46,5	39,0	39,5	39,6	2,68	0,064	0,039	0,034
Leusiini	62,9	55,3	50,5	52,5	2,98	<0,001	0,107	0,011
Lysiini	52,5	47,4	45,7	48,5	2,58	0,065	0,437	0,016
Metioniini	13,5	10,9	10,8	10,8	0,089	0,076	0,086	0,091
Treoniini	30,5	27,5	26,2	30,8	2,39	0,818	0,686	0,078
Tryptofaani	5,25	5,21	4,80	5,75	0,586	0,943	0,452	0,409
Valiini	60,0	53,2	47,1	51,0	2,99	<0,001	0,421	0,009
Välttämättömät aminohapot	342	300	272	299	17,3	0,002	0,445	0,003
Ei-välttämättömät aminohapot	274	240	239	268	21,6	0,843	0,885	0,113
Aminohapot yhteensä	617	540	498	567	37,3	0,099	0,886	0,014