

**MIKROLEVÄT SOIJAN KORVAAJANA LYPSYLEHMIEN  
VALKUAISRUOKINNASSA**

Salla Laukkanen

Maisterintutkielma

Helsingin yliopisto

Maataloustieteiden laitos

Kotieläinten ravitsemustiede

Maaliskuu 2017

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Salla Laukkanen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Mikrolevät soijan korvaajana lypsylehmien valkuaisruokinnassa			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma		Aika — Datum — Month and year Maaliskuu 2017	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 73
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Mikrolevät ovat ravintoainekoostumukseltaan erinomaisia, tehokkaasti biomassaa tuottavia ja vaatimattomissa olosuhteissa kasvavia yksisoluisia organismeja, joiden rehukäyttö on laajenemassa vesiviljelystä myös kotieläintuotantoon. Tarve uudentyyppisille valkuaisrehuille on suuri, kun tavoitteena on vähentää rehut tuotannon ympäristöhaittoja ja kilpailua ruoantuotannon kanssa. Tässä tutkimuksessa selvitettiin mikrolevien soveltuvuutta lypsylehmien valkuaisruokintaan korvaamalla väkirehun soijavaluainen kokonaan mikrolevävalkuaisella. Ruokintakokeessa tutkittiin valkuaislähteen vaikutusta lypsylehmien syöntiin, maitotuotukseen ja maidon koostumukseen, aminohappojen saantiin ja niiden käyttöön maitorauhasessa sekä plasman metaboliitteihin.</p> <p>Tutkimus toteutettiin Viikin opetus- ja tutkimustilalla kesällä 2014. Koemallina oli 4x4 latinalainen neliö, jossa oli neljä useamman kerran poikinnutta ayrshire-lehmää ja neljä erilaista koeruokintaa (valkuaisrehuna soijarouhe (<i>Glycine max</i>), <i>Spirulina platensis</i>, <i>Chlorella vulgaris</i> tai <i>Chlorellan</i> ja <i>Nannochloropsis gaditanan</i> 1:1-seos). Väkihuseokset (12,5 kg/pv) olivat valkuaisruokinnan osalta isonitrogeenisia. Väkihuseosten perustana oli viljaleikeseos. Koelehmät saivat lisäksi vapaasti nurmisäilörehua. Koejakso koostui kahdesta totutusviikosta ja yhdestä keruuviikosta, ja yhteensä koe kesti 12 viikkoa. Koeruokintojen vaikutusta lehmien syönnin, ravintoaineiden saannin sekä maitosonta- ja verinäytteiden avulla.</p> <p>Mikroleväväkirehut vähensivät lehmien väkirehun syöntiä, mutta kuiva-aineen saanti dieetistä pysyi samana lehmien lisätessä vastaavasti säilörehun syöntiä. Maitotuotoksessa ja maidon koostumuksessa ainoa tilastollinen ero koeruokintojen välillä oli maidon rasvapitoisuuden lievä lisääntyminen mikroleväruokinnassa. Mikroleväruokinta lisäsi plasman etikkahapon ja vapaiden rasvahappojen pitoisuuksia ja vähensi insuliinipitoisuutta, sekä vaikutti näiden metaboliittien aineenvaihduntaan maitorauhasessa. Tulokset viittasivat lievään pötsikäymiseen ja maitorauhasen toiminnan muuttumiseen mikroleväruokinnan vaikutuksesta. Erot aminohappoaineenvaihdunnassa ruokintojen välillä olivat pääasiassa pieniä, mutta maitorauhasen otto-eritys -suhteen perusteella metioniini näytti olevan rajoittavin aminohappo kaikissa ruokinnassa.</p> <p>Tämän tutkimuksen perusteella mikrolevät ovat ravintoainekoostumukseltaan ja maitotuotosvasteiltaan vähintäänkin soijan veroisia valkuaisrehuja lypsylehmien ruokinnassa. Mikrolevien soijaa huonompi maittavuus, levärehun kalliit tuotantokustannukset ja tutkimustiedon vähäisyys kotieläinten mikroleväruokinnasta hidastavat mikrolevien hyödyntämistä kaupallisessa mittakaavassa.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords mikrolevä, soja, valkuaisrehu, lypsylehmä, aminohappo, maidontuotanto			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden laitos			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työn ohjaaja: tutkijatohtori Anni Halmemies-Beauchet-Filleau			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Salla Laukkanen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Microalgae as a substitute for soy in protein feeding of dairy cows			
Oppiaine — Läroämne — Subject Animal nutrition			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year March 2017	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 73
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Microalgae are unicellular organisms with excellent nutritional composition, ability to efficiently produce biomass and low environmental demands. The use of microalgae in animal feeds is common in aquaculture and newly introduced to animal husbandry. There is a growing need for alternative protein feeds to diminish the environmental cost of feed production and competition with food production. This research examined if soy protein can be replaced with microalgal protein in concentrate feeding of dairy cows. The effect of protein source on feed intake, milk production, milk composition, amino acid intake and use in mammary gland as well as plasma metabolites were evaluated.</p> <p>The feeding experiment was conducted in the research farm of the University of Helsinki in the summer of 2014. The study design was a 4x4 Latin square with four multiparous ayrshire dairy cows and four different experimental diets (isonitrogenously soybean meal (<i>Glycine max</i>), <i>Spirulina platensis</i>, <i>Chlorella vulgaris</i> or 1:1 mixture of <i>Chlorella</i> and <i>Nannochloropsis gaditana</i> as protein feed). The experimental concentrates (12.5 kg/d) were based on cereals and molassed sugarbeet pulp. The cows were given grass silage ad libitum. The physiological feeding experiment lasted for 12 weeks, with four experimental periods of three weeks. Feed intake was recorded and samples of feed, milk, feces and blood were taken to determine the effect of the experimental feeds on the cows.</p> <p>Inclusion of microalgae lowered the intake of concentrate feeds, but overall dry matter intake remained unchanged as the intake of grass silage was increased. The only effect on milk production and milk composition was the slightly higher fat concentration of milk when microalgal feeds were fed. In plasma, acetic acid and free fatty acid concentrations were higher and insulin concentrations lower when feed included microalgae, and also the mammary metabolism of these metabolites was affected by the experimental diets. The results refer to slight changes in rumen fermentation and mammary gland metabolism when microalgae replaced soy in the feeds. The effects of different feeds on amino acid metabolism were minor. Based on mammary uptake-output ratio, the most limiting amino acid in all diets seemed to be methionine.</p> <p>Based on the results of this experiment, microalgal feeds are equal or even slightly superior to soy as a protein feed of dairy cows when it comes to nutritional composition and productive responses. Inferior palatability of microalgae compared to soy, high production costs of microalgal feeds and lack of systematic scientific research are nevertheless hindering the large-scale commercial use of microalgae in domestic animal feeds.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords microalgae, soy, protein feed, dairy cow, amino acid, milk production			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisor: postdoctoral researcher Anni Halmemies-Beauchet-Filleau			

# Sisällys

Lyhenteet.....	6
1 Johdanto .....	7
2 Mikrolevät rehukäytössä .....	9
2.1 <i>Spirulina</i> .....	11
2.2 <i>Chlorella</i> .....	11
2.3 <i>Nannochloropsis</i> .....	12
2.4 Mikrolevien ravintoainekoostumus .....	12
2.5 Valkuaisruokinta ja lehmien ravintovaatimukset .....	13
2.6 Tutkimuksia mikrolevien käytöstä rehuissa .....	16
3 Tutkimuksen tavoitteet.....	19
4 Aineisto ja menetelmät.....	20
4.1 Rehujen koostumus .....	20
4.2 Ruokinnan toteutus.....	22
4.3 Syönti ja maidontuotanto .....	24
4.4 Näytteidenotto ja analysointi.....	24
4.4.1 Elopaino ja kuntoluokitus.....	25
4.4.2 Maitonäytteet .....	25
4.4.3 Sontanäytteet .....	25
4.4.4 Verinäytteet .....	26
4.4.5 Säilörehunäytteet .....	26
4.4.6 Väkirehunäytteet.....	27
4.5 Tulosten laskenta.....	28
5 Tulokset.....	30
5.1 Rehujen koostumus .....	30
5.2 Syönti ja ravintoaineiden sulavuus.....	32
5.3 Maidontuotanto ja maidon koostumus .....	34
5.4 Plasman aineenvaihduntatuotteet .....	35
5.5 Plasman aminohapot .....	38
6 Tulosten tarkastelu .....	42
6.1 Koerehujen koostumus .....	42
6.2 Syönti ja ravintoaineiden sulavuus.....	44

6.3 Maitotuotos ja maidon koostumus .....	49
6.4 Plasman aineenvaihduntatuotteet .....	54
6.5 Plasman aminohapot .....	57
7 Johtopäätökset.....	60
Kiitokset .....	61
Lähteet.....	62
Liite 1. ....	73

## Lyhenteet

AIA	happoon liukenematon tuhka
BCAA	haaraketjuiset aminohapot
BHBA	$\beta$ -hydroksivoihappo
CLA	konjugoitu linolihappo
DHA	dokosaheksaenihappo
EKM	energiakorjattu maitotuotos
EPA	eikosapentaenihappo
iNDF	sulamaton neutraalidetergenttikuitu
NDF	neutraalidetergenttikuitu
NEFA	vapaat rasvahapot
NPN	ei-valkuaistyyppi
VFA	haihtuvat rasvahapot

## 1 Johdanto

Ruoankulutuksessa on havaittavissa maailmanlaajuinen suuntaus eläintuotteiden, kuten lihan ja maidon, kysynnän kasvussa niiden korvatesa aikaisemmin viljoihin ja muihin kasviperäisiin ruoka-aineisiin perustuvaa ruokavaliota. Tätä trendiä edistävät erityisesti väestönkasvu ja kulutustason nousu Afrikassa ja Aasiassa yhdistettynä länsimaiden jo valmiiksi korkeaan elintasoon ja kuluttajien vaatimukseen (Godfray ym. 2010, Makkar 2012). Luonnonympäristöjen raivaaminen viljelymaaksi etenkin trooppisilla alueilla, kalakantojen ehtyminen ja makean veden rajallisuus ovat ajankohtaisia ongelmia kotieläinten valkuaisrehujen tuotannossa. Resurssien rajallisuus vaatii toimintatapojen ja raaka-aineiden hyväksikäytön tehostamista (Godfray ym. 2010, Gill 2012, Makkar 2012).

Mikrolevien erinomaiset ravitsemukselliset ominaisuudet ja vaatimattomat kasvatusolosuhteet viljelykasveihin verrattuna ovat lisänneet kiinnostusta niiden käyttöön useilla kotieläinravitsemuksen aloilla (Belay 2013). Mikrolevälajien monimuotoisuus ja ominaisuuksien vaihtelu on erittäin suurta, mutta pääasiassa niiden kuivapainossa on runsaasti muun muassa valkuaista, rasvahappoja, vitamiineja ja kivennäisaineita (Quigley ym. 2009, Becker 2013). Tämä mahdollistaa lukuisat sovellukset, joissa mikroleviä voidaan hyödyntää korvaamaan ekologisesti kestävämpiä raaka-aineita, kuten esimerkiksi soijaa (*Glycine max*) ja maissia (*Zea mays*) rehu- ja bioenergiatuotannossa (Lum ym. 2013, Costa ym. 2016).

Soijan käyttö kotieläinten rehuissa perustuu sen suureen valkuaispitoisuuteen ja tasapainoiseen aminohappokoostumukseen eläinten tarpeeseen nähden. Beckerin (2007) mukaan mikrolevien aminohappokoostumus on samankaltainen kuin soijan, ja märehitjät pystyvät pötsimikrobiston avulla sulattamaan mikrolevien rakenteita ja saamaan ravintoaineet käyttöönsä yksimahaisia paremmin (Skrede ym. 2011, Becker 2013). Uusia valkuaisrehuvaihtoehtoja etsitään jatkuvasti, sillä esimerkiksi Suomessa ja muualla Euroopassa kotieläintuotanto on vahvasti riippuvaista tuontisoijasta (Peltonen-Sainio ym. 2013, Kaukovirta-Norja ym. 2015). Alhainen valkuaisrehujen omavaraisuus lisää taloudellista riskiä markkinahintojen ja saatavuuden heilahteluiden mukaan, ja suuret tuontimäärät epätasapainottavat ravinteiden maailmanlaajuisista kiertoa (Gill 2012). Kotimai-

set valkuaisrehut, kuten rypsi, härkäpapu ja herne, eivät pysty tällä hetkellä kilpailemaan soijan kanssa sadon epävarmuuden, pienen tuotantopinta-alan sekä pienemmän valkuaispitoisuuden ja yksimahaisten kohdalla epätasapainoisemman aminohappokoostumuksen takia (Peltonen-Sainio ym. 2013, Luke 2016). Lisäksi härkäpapu sisältää haitta-aineita, jotka rajoittavat sen käyttöä yksimahaisten ruokinnassa (Puhakka ym. 2012, Koivunen 2016).

Mikrolevät ovat maataloudessa potentiaalisia raaka-aineita monesta näkökulmasta. Rehukasvien tuotantoon verrattuna mikrolevät kasvavat vaatimattomissa olosuhteissa ja kuluttavat melko vähän resursseja, eivätkä ne kilpaile ruoantuotannon kanssa peltopinta-alasta (Kuhad ym. 1997, Ma ym. 2016). Yksisoluiset mikrolevät lisääntyvät nopeasti tuottaen tehokkaasti biomassaa (Dismukes ym. 2008, Ma ym. 2016). Viimeaikaisten tutkimusten perusteella mikrolevissä on paljon vielä hyödyntämätöntä potentiaalia esimerkiksi rehualalla. Perinteisesti trooppisissa maissa kasvatettujen mikrolevien tuotantoa pystytään soveltamaan teknologian avulla myös Suomeen ja Eurooppaan, ja kiinnostus mikroleviä kohtaan on lisääntynyt, vaikka suurin askel pienimuotoisesta levänkasvatuksesta kaupalliseen mittakaavaan on vielä edessä (Lunkka-Hytönen ym. 2016).

Mikrolevien heikkoutena lypsylehmien ruokinnassa voi olla huonompi maittavuus muihin rehuaineisiin verrattuna, minkä oletetaan johtuvan mikrolevien sisältämistä tyydyttymättömistä rasvahapoista (Franklin ym. 1999, Boeckert ym. 2008, Moate ym. 2013). Tarsian (2016) mukaan syönti sekä maito- ja valkuaisuotos vähenivät, kun *Spirulina platensis*-mikrolevän valkuainen korvasi puolet seosrehun rypsirouheen valkuaisesta. Ylisen (2015) kokeessa *Spirulina platensiksen* ja *Chlorella vulgariksen* seos korvasi väkirehussa puolet tai koko osuuden rypsirouheen valkuaisesta ilman vaikutusta syöntiin tai maitotuotokseen. Rypsi on suomalaisessa nurmisäilörehuun ja viljaan perustuvassa lypsylehmien ruokinnassa yleisempi ja paremmin ravintoaineiden tarvetta täydentävä valkuaisrehu kuin soija (Huhtanen ym. 2011), joten mikrolevät pystyvät todennäköisesti korvaamaan soijaa lehmien valkuaisrehuna paremmin kuin Ylisen (2015) ja Tarsian (2016) tutkimuksissa rypsiä.



## 2 Mikrolevät rehukäytössä

Mikrolevät ovat yksisoluisia yhteyttäviä organismeja. Vaikka mikrolevät tuottavat energiaa auringonvalosta ja muista lähtöaineista fotosynteesin kautta, ne muistuttavat rakenteeltaan enemmän bakteereja kuin kasveja. Mikrolevät ovat hyvin monimuotoinen ryhmä ja ne ovat levittäytyneet äärimmäisiinkin olosuhteisiin maapallolle (Singh ja Saxena 2015). Mikroleviä esiintyy muun muassa sekä suolaisessa että makeassa vedessä, maaperässä, kuumissa lähteissä ja symbioosissa muiden eliöiden kanssa (Singh ja Saxena 2015). Ekologisesti mikrolevät ovat merkitykseltään lähes korvaamattomia, sillä tuottajina ne muodostavat kasvien kanssa perustan ravintoketjuille ja ylläpitävät ekosysteemin tasapainoa kierrättämällä ravinteita epäorgaanisista yhdisteistä eliöille hyödylliseen muotoon ja hillitsevät olosuhteiden muutoksia (Barsanti ja Gualtieri 2006).

Mikrolevien tuotannon kannalta tärkeimpiä luokkia ovat viherlevät (*Chlorophyceae*) sekä ruskeisiin leviin kuuluvat kultalevät (*Chrysophyceae*) ja piilevät (*Bacillariophyceae*). Näiden lisäksi syanobakteerit eli sinilevät (*Cyanophyceae*) ovat merkittäviä organismeja, ja ne luokitellaan bakteerimaisista ominaisuuksistaan huolimatta mikroleviksi (Venkatesan ym. 2015). Makro- ja mikroleviä on jo pitkään käytetty ruoka-aineena (Yuan 2008, Becker 2013). Leväravintoa hyödynnetään etenkin levien luontaisilla esiintymisalueilla Aasiassa, Afrikassa ja Etelä-Amerikassa, jossa ne ovat osa kulttuuri- ja ruokaperinnettä.

Yhteyttämisen lähtöaineena mikrolevät käyttävät pääasiassa hiilidioksidia ja muita ravinnemolekyyleihin tarvittavia rakennusaineita, kuten tyyppiä valkuaisaineisiin (Andersen 2013). Mikrolevät varastoivat energian kasvien sokerintuotannosta poiketen lähinnä valkuaisaineina ja lipideinä (Andersen 2013, Lee ym. 2013, Costa ym. 2016). Mikrolevät keräävät lipidejä solun sisään öljypisaroina, ja valkuaisaineet sijaitsevat pääasiassa soluseinämän rakenteissa (Andersen 2013). Yksisoluisten eliöiden tapaan mikrolevät lisääntyvät suvuttomasti jakaantumalla (Barsanti ja Gualtieri 2006, Habib ym. 2008). Kasvisoluihin verrattuna mikrolevissä on enemmän sulavaa ravintomateriaalia. Mikrolevien metabolia mukautuu herkästi ympäristön olosuhteisiin (muun muassa valoisuus, lämpötila, suolaisuus ja kasvuston tiheys) ja ravinnetilanteeseen, joten mikrolevien koostumusta pystytään säätelemään kasvatusolosuhteita muuttamalla (Hu 2013).

Taloudellisesti tärkeimpiä ja suuressa mittakaavassa tuotettuja mikroleviä ovat muun muassa viherlevät *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* ja syanobakteeri *Spirulina maxima* (Becker 2013). Viime vuosikymmeninä mikrolevien hyödyntäminen on yleistynyt voimakkaasti monilla tuotantoaloilla. Kuivatun mikrolevän ravinteikkaus ja terveyttä edistävät ominaisuudet, kuten immuunipuolustuksen vahvistaminen ja syövän ehkäisy, lisäävät mielenkiintoa ja kysyntää ihmisravitsemuksessa, ja esimerkiksi *Chlorella*- ja *Spirulina*-ravintolisiä on mahdollista ostaa jauheena, kapseleina ja tabletteina (Belay 2013, Kovač ym. 2013, Liu ja Hu 2013).

Eläinten rehuissa mikroleviä on käytetty pääasiassa vesiviljelyssä kalojen ja simpukoiden sekä pienimuotoisesti kanojen ruokinnassa (Belay 2013, Liu ja Hu 2013) ja vasta viime vuosina tutkimustasolla muiden suurempien kotieläinten ruokinnassa (Spolaore ym. 2006). Märehtijöiden suhteen tutkimus on ollut vielä hyvin vähäistä (Becker 2013). Ravitsemuksellisen käytön lisäksi mikrolevät tarjoavat potentiaalisia sovellusmahdollisuuksia esimerkiksi biopolttoaineiden tuotannossa, jätevesien puhdistamisessa ja lääketieteessä (Dismukes ym. 2008, Habib ym. 2008, Liu ja Hu 2013, Venkatesan ym. 2015, Ma ym. 2016). Tässä tutkimuksessa koerehuiksi valittiin *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* ja *Nannochloropsis gaditana* (tästä eteenpäin *Spirulina*, *Chlorella* ja *Nannochloropsis*, vastaavasti), jotka ovat melko tunnettuja mikroleviä ja kaupallisessa tuotannossa, mutta joiden käyttöä lypsylehmien ruokinnassa ei ole juuri tutkittu.

Perinteisiin märehtijöiden valkuaisrehuihin, kuten soijaan ja rypsiin verrattuna mikrolevien rehukäytössä on monia tuotannollisia ja ravitsemuksellisia etuja. Valkuaisrehuna käytettäviin kasveihin verrattuna mikrolevät tuottavat suhteessa kasvatuspinta-alaan enemmän valkuaisaineita ja muita hyödyllisiä ravintoaineita, jotka ovat eläimille hyvin sulavassa käyttökelpoisessa muodossa ja vastaavat koostumukseltaan hyvin eläinten ravintoaineiden tarvetta (Kuhad ym. 1997, Becker 2007). Mikrolevien tuotannossa ei ole samanlaisia ongelmia kuin kasvinviljelyssä ja kalastuksessa, joiden kohdalla esimerkiksi sääolosuhteiden vaikutus, kilpailu ihmisravinnoksi tarkoitetun ruoantuotannon kanssa ja viljelykelpoisen maa-alan saatavuus ovat merkittäviä ongelmia (Kuhad ym. 1997).

## 2.1 *Spirulina*

*Spirulina* kuuluu syanobakteereihin eli sinileviin (Barsanti ja Gualtieri 2006, Venkatesan ym. 2015). *Spirulina*-suvusta kaupallisesti tärkeimmät lajit ovat *Spirulina platensis* ja *Spirulina maxima* (Belay 2013). *Spirulina* on rakenteeltaan haarautumaton, kiertynyt sauva, jossa yksittäiset leväsolut ovat kiinnittyneet toisiinsa peräkkäin (Andersen 2013, Belay 2013). Soluseinän neljä kerrosta ovat muodostuneet selluloosan sijaan bakteereille tyypillisestä peptidoglykaanista, jonka aminohapot lisäävät *Spirulinan* valkuaispitoisuutta (Andersen 2013, Belay 2013).

Kasvatusympäristön vaikutuksen takia mikrolevien yleispäteviä, tarkkoja ravintoainepitoisuuksia on vaikea määrittää. *Spirulina platensis*-laji sisältää kirjallisuuden perusteella 460-630 g/kg ka valkuaista, 40-90 g/kg ka lipidejä ja 80-140 g/kg ka hiilihydraatteja (Becker 2007).

## 2.2 *Chlorella*

*Chlorella* on yksisoluihin viherlevä, joka luokitellaan varsinaisten viherlevien pääjaksoon (Barsanti ja Gualtieri 2006, Liu ja Hu 2013). *Chlorella* kasvaa sekä makeassa että suolaisessa vedessä ja maalla. Soluseinä on jäykkä ja tukeva, tosin sen koostumus voi vaihdella lajin sisällä olosuhteista riippuen (Becker 2013, Liu ja Hu 2013). Märehtijöiden pötsimikrobit saavat sulatettua ja hyödynnettyä leväsolun ravintoaineita yksimaisten ruoansulatusentsyymejä paremmin (Becker 2013).

Valkuaisaineita voi olla optimaalisessa tilanteessa jopa 70 % levän kuivapainosta, mutta ympäristön stressin alaisena *Chlorella* varastoi solun sisälle tärkkelystä ja öljyä (Andersen 2013, Becker 2013), jolloin lipidien osuus kuivapainosta voi olla 50 % (Liu ja Hu 2013). Suotuisissa olosuhteissa kasvavan *Chlorellan* kuivapainosta noin 60 % on valkuaisaineita, 10-15 % hiilihydraatteja ja 12-15 % lipidejä (Liu ja Hu 2013). Näiden lisäksi kuivatussa levässä esiintyy pieniä määriä esimerkiksi kivennäisaineita ja pigmenttejä.

### 2.3 *Nannochloropsis*

*Nannochloropsis* on yksisoluinen mikrolevä, joka kuuluu laajaan ruskeiden levien pääjaksoon (Barsanti ja Gualtieri 2006, Andersen 2013, Ma ym. 2016). Sukuun kuuluu sekä makeassa vedessä että merivedessä kasvavia lajeja (Freire ym. 2016). *Nannochloropsis*-suvun levien soluseinä on *Chlorellan* tapaan jäykkä ja kestävä (Borowitzka 2013), joten solunsisäisten ravintoaineiden hyödyntäminen edellyttää solun rikkomista. Toisaalta *Nannochloropsis* sietää melko hyvin käsittelyä esimerkiksi levämassan kasvatuvaiheessa ja rehunvalmistuksessa.

*Nannochloropsis* pystyy varastoimaan sisäänsä erityisesti eikosapentaenihappoa eli EPA:ta (Reboloso-Fuentes ym. 2001, Andersen 2013, Freire ym. 2016, Ma ym. 2016). *Nannochloropsisista* käytetään rehuissa esimerkiksi eläintuotteiden rasvahappokoostumuksen muokkaamisessa (Bruneel ym. 2013). Lipidien kertymistä leväsoluihin pystytään edistämään muuttamalla kasvatusolosuhteita, kuten hidastamalla levän kasvua vähentämällä valaistusta (Reboloso-Fuentes ym. 2001, Ma ym. 2016). Matos ym. (2016) määrittivät tutkimuksessaan *Nannochloropsisin* kahden lajin (*N. gaditana* ja *N. oculata*) koostumuksen, jossa kuiva-aineesta 41-42 % oli valkuaisaineita, 8-16 % lipidejä ja 16-19 % hiilihydraatteja.

### 2.4 Mikrolevien ravintoainekoostumus

Mikrolevien sisältämistä orgaanisista perusmolekyyleistä enin osa on yleensä valkuaisaineita, sitten lipidejä ja vähiten hiilihydraatteja (Becker 2013). Aminohappokoostumukseltaan mikrolevät vastaavat eläinten tarvetta lähes soijavalkuaisen kaltaisesti, mutta optimaalisiin eläinperäisiin valkuaisuotteisiin, kuten kananmunaan verrattuna mikrolevissä on vähemmän esimerkiksi metioniinia ja kysteiniä (Habib ym. 2008, Becker 2013). Lysiiniä on useissa mikrolevissä jopa enemmän kuin kananmunassa tai soijassa, mutta käyttökelpoisen lysiinin määrä voi vähentyä merkittävästi rehujen lämpökäsittelyn seurauksena (Becker 2013). Nurmisäilörehuun ja viljaan perustuvassa lypsylehmien ruokinnassa tuotantoa rajoittaa yleensä välttämättömistä aminohapoista ensimmäisenä histidiini (Kim ym. 1999, Vanhatalo ym. 1999), ja sen määrä on mikrolevissä yleensä hieman kananmunaa ja soijaa pienempi (Becker 2013). Välttämättömät aminohapot on

saatava elimistöön rehun mukana, joten puutteellinen dieetti rajoittaa valkuais synteesiä ja tuottavuutta. Nuorissa leväsoluissa on suhteellisesti enemmän valkuaisaineita, koska vanhemmat solut varastoivat sisäänsä herkemmin lipidejä (Andersen 2013). Mikrolevien laskennallisesta raakavalkuaispitoisuudesta noin 10 % on ei-valkuais tyyppiä, jota useimpien eläinten on vaikea hyödyntää (Becker 2013, Lum ym. 2013). Meressä kasvavissa kasveissa ja eliöissä on runsaasti pitkäketjuisia, monityydyttymättömiä PUFA-rasvahappoja, joita elimistö ei pysty itse syntetisoimaan, joten mikrolevät ovat myös rasvahappoprofiililtaan erinomaisia ravinnonlähteitä. Mikrolevien hiilihydraatit eivät ole kovin merkityksellisiä ruokinnallisesta näkökulmasta, mutta levärehun puhdistamisen kokonaan hiilihydraateista epäillään olevan haitaksi ruoansulatuksen normaalille toiminnalle (Becker 2013).

Mikrolevissä voi esiintyä luontaisia myrkkijä ja merestä eliöihin kertyviä raskasmetalleja (Becker 2013), jotka ovat suurina määrinä haitallisia tuotantoeläimille. Myös yleisimmin käytetyissä mikrolevälajeissa esiintyy myrkyllisiä yhdisteitä, nukleiinihappoja ja ympäristöperäisiä raskasmetalleja (Becker 2013, Lum ym. 2013), mutta oikeanlaisen käsittelyn ja lajikkeiden valinnan ja muuntelun avulla haitalliset aineet saadaan poistettua.

Muiden rehujen korvaaminen mikrolevillä edellyttää, ettei suuresta mikrolevämäärästä ole haittaa eläimen terveydelle, tuottavuudelle tai syönnille. Beckerin (2007) mukaan kirjallisuudessa ei ole raportoitu mikrolevistä johtuvista negatiivisista vaikutuksista. Wullepit ym. (2012) päättelivät mikrolevärehun monityydyttymättömien rasvahappojen olevan alttiina hapettumiselle, joten mikrolevärehun olisi suositeltavaa sisältää riittävästi antioksidantteja.

## **2.5 Valkuaisruokinta ja lehmien ravintovaatimukset**

Lypsylehmien ruokinnassa käytetään perinteisesti karkearehun ja väkirehun seoksia, koska mikään rehu ei yksinään tyydytä korkeatuottoisen lypsylehmän tarpeita, ja pötsin luontaisen toiminnan kannalta myös riittävä kuidun saanti on tärkeää (McDonald ym. 2011). Lypsylehmät tarvitsevat aminohapoista koostuvaa valkuaisa kudostensa ylläpitoon ja kasvuun, maidontuotantoon ja pötsimikrobien valkuais synteesin- ja energianlähteeksi (Freer ym. 2007). Märehtijöiden valkuaisentarpeeseen ja -saantiin on pötsin me-

tabolian ja ruoansulatuksen monimutkaisuuden takia kiinnitettävä erityistä huomiota. Pötsimikrobit sekä kuluttavat että tuottavat valkuaista, mikrobit pystyvät käyttämään hyväkseen myös rehun ei-valkuaiestyyppeä, ja valkuaisen tarve vaihtelee voimakkaasti etenkin lypsylehmien tuotantovaiheen mukaan (Freer ym. 2007, McDonald ym. 2011). Aminohappojen tarve kehossa on jatkuvaa valkuaisaineiden syntetisoinnin ja hajotuksen takia (Freer ym. 2007).

Lehmän suolistosta imeytyy aminohappoina sekä pötsissä muodostunutta mikrobivalkuaista että pötsissä hajoamatonta rehuperäistä valkuaista (NRC 2001, Freer ym. 2007). Useimmiten lypsylehmien ruokinnassa rajoittavimpia aminohappoja ovat histidiini, lysiini ja metioniini, johtuen yleisesti käytettyjen rehujen aminohappokoostumuksesta (Vanhatalo ym. 1999, NRC 2001, Lum ym. 2013). Esimerkiksi maissi sisältää vähän lysiniä, ja soijassa on eläinten tarpeeseen nähden pieni metioniinipitoisuus (NRC 2001, Luke 2016). Kotimaisista valkuaisrehuista sekä härkäpavussa että herneessä on runsaasti lysiniä mutta vain vähän metioniinia (Luke 2016, Puhakka ym. 2016). Pötsissä muodostuneessa mikrobivalkuaisessa (Korhonen ym. 2002b) on tyypillisesti rypsi- ja soija-valkuaista vähemmän histidiiniä (Luke 2016), mikä korostaa ruokinnan merkitystä välttämättömien aminohappojen lähteenä. Erityisesti nurmisäilörehuun perustuvassa ruokinnassa histidiini voi olla maidontuotantoa rajoittava aminohappo (Vanhatalo ym. 1999). Haaraketjuiset aminohapot, eli isoleusiini, leusiini ja valiini, ovat tärkeitä valkuaisaineiden rakenneaineita maidossa ja lihaksissa, joten niiden saannilla voi olla yhteys lehmien maitotuotokseen ja lihasmassan säilymiseen (Appuhamy ym. 2011).

Märehtijöiden pötsimikrobit pystyvät käyttämään ravintonaan monipuolisesti erilaisia valkuaisaineita ja typpiyhdisteitä, joita yksimahaiset eivät pysty hyväksikäyttämään. Esimerkiksi säilörehun käymisen seurauksena ja ruoansulatuskanavan mikrobiston toiminnan takia typpiyhdisteiksi hajoava valkuainen on vielä pötsimikrobien hyödynnettävissä (McDonald ym. 2011). Eläinten tarvetta hyvin vastaavan valkuaisruokinnan tarkoitus on ravintoaineiden riittävän saannin lisäksi hillitä ammoniakkin ja muiden elimistöstä poistuvien sivutuotteiden muodostumista (Miller 2004, Kaukovirta-Norja ym. 2015).

Eläinten ruokinnassa ja rehuteollisuudessa tärkeimpiä valkuaisenlähteitä ovat öljykasvien, kuten soijan, rypsin ja auringonkukan, siemenet (McDonald ym. 2011). Soijan suurimmat tuottajamaat ovat Yhdysvallat, Brasilia ja Argentiina (Niemi ja Huan-Niemi

2012), mutta sen käyttö on maailmanlaajuisia. Euroopassa lähes kaikki broilerit, puolet sioista ja noin 20 % lehmistä saa soijarehuun perustuvaa valkuaisrehua, ja Aasiassa, erityisesti Kiinassa, rehuaineiden tarve kasvaa kotieläintuotannon voimistuessa, joten riippuvuus tuontisoijasta on suurta (Niemi ja Huan-Niemi 2012). Suomessa lypsylehmien valkuaisruokinnassa käytetään rypsiä, jota voidaan tuottaa myös kotimaisesti. Soijassa on rypsiä enemmän raakavalkuaista, mutta rypsi Valkuaisen aminohappokoostumus vastaa paremmin lypsylehmien tarvetta kuin soijavalkuainen (Huhtanen ym. 2011). Huhtasen ym. (2011) meta-analyysin perusteella rypsi on vähintään soijan veroinen valkuaisrehu parantaen lypsylehmien maito- ja valkuaisuutosta soijaruokintaan verrattuna.

Kalajauho ja kalaöljy ovat eläintuotannon pääasiallisia rehuaineita vesiviljelyssä, ja kalajauhoa käytetään pieninä määrinä valkuaislisänä myös yksimahaisten kotieläinten ruokinnassa. Valtavasta tuotannosta huolimatta soija- ja kalaperäisille rehuille etsitään vaihtoehtoisia, tuotannollisesti kestävämpiä valkuaislähteitä (Kuhad ym. 1997, Skrede ym. 2011). Valkuaisrehut ovat usein ruokinnan kallein osa (Freer ym. 2007). Eläinten dieettien mukauttaminen mahdollisimman hyvin tarvetta vastaavaksi vähentää ympäristön kuormitusta ja rehukustannuksia sekä tehostaa tuotantoa (Patton ym. 2014). Valkuaisrehuja valittaessa on huomioitava entistä enemmän rehujen kasvatusmenetelmät, resurssien kulutus ja ekologinen kestävyys, sillä vain tuotannonlisäykseen tähtäävä ruokinta ei ole kannattavaa (Niemi ja Niemi-Huan 2012). Valkuaisen ylikuormitus lisää sen hukkaa virtsassa, kuluttaa metaboliassa turhaan energiaa valkuaisaineiden prosessoinnin takia ja rasittaa maksaa ja munuaisia, koska elimistön kapasiteetti valkuaisruokinnan suhteen on rajallinen (Hof ym. 1997, NRC 2001, Miller 2004). Mikrolevien sisältämien vitamiinien ja kivennäis- ja hivenaineiden ansiosta leväruokinta voi korvata valkuaislähteiden lisäksi premix-sekoituksia, joiden tarkoituksena on täydentää ruokinnan hivenainekoostumusta (Holman ja Malau-Aduli 2013).

## 2.6 Tutkimuksia mikrolevien käytöstä rehuissa

Mikroleviä on tutkittu osana vesi- ja maaeläinten dieettiä, ja tarkoituksena on yleensä eläimen rasvahappokoostumuksen muokkaaminen, valkuaisuutannon tehostaminen tai pigmenttiaineiden lisääminen rehuun. Jo vähäinen mikroleväruokinta, esimerkiksi mikrolevien osuuden ollessa vain muutamia prosentteja koko ruokinnasta, voi saada aikaan tuotannollisia etuja. Toisaalta mikroleviä voidaan käyttää suurempina määrinä korvaamaan muita valkuaisrehuja. Kalojen ruokintakokeista on saatu lupaavia tuloksia muun muassa kasvun ja terveysominaisuuksien suhteen, ja mikrolevät ovat mahdollinen vaihtoehto korvaamaan ruokinnassa kallista kalajauhoa (Belay ym. 1996) ja kalaöljyä (Matos ym. 2016). Mikrolevien positiivinen vaikutus tuotantoeläimiin on havaittu muun muassa kirjolohen (Sirakov ym. 2012), niilintilapian (Sarker ym. 2016) ja karpin (Abdulrahman ja Ameen 2014) ruokinnassa. Tutkimukset vesiviljelyn alalla antavat viitteitä mikrolevien eduista eläinten rehuissa, mikä luo odotuksia mikrolevien käytön ulottamiseen myös maaeläimille.

Munijakanojen rehun koostumuksella vaikutetaan munantuotannon lisäksi esimerkiksi keltuaisen sävyyn (Gouveia ym. 2008). Kanamunien monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuuden lisäämiseen käytetään yleensä kalajauhoa, mutta myös mikrolevät saavat aikaan samanlaisia hyödyllisiä muutoksia kananmunan ravintoarvoissa (Bruneel ym. 2013). *Nannochloropsis gaditanan* lisääminen kanojen rehuun edisti rehun EPA:n muuntumista keltuaisen dokosaheksaeenihapoksi (DHA) mikrolevän korvatessa 5-10 % perusdieetistä (Bruneel ym. 2013). Kyseisessä tutkimuksessa mikroleväruokinta ei vaikuttanut kanojen syöntiin, painoon tai tuotanto-ominaisuuksiin. Spolaoren ym. (2006) mukaan 5-10 % siipikarjan valkuaisrehuista voidaan korvata mikrolevillä. Suurempi ruokintamäärä voi aiheuttaa pitkällä aikavälillä syönnin ja tuottavuuden heikkenemistä.

Nisäkkäiden, kuten sikojen, lampaiden ja nautojen, ruokinnassa mikrolevät voivat korvata osittain muita valkuaisrehuja (Gouveia ym. 2008). Christaki ym. (2012) havaitsivat maidon rasvahappokoostumuksessa muutoksia, kun lypsylehmien rehuun lisättiin 40 g *Spirulina*-jauhetta päivässä. Maito sisälsi enemmän tyydyttymättömiä rasvahappoja kuin kontrolliruokinnassa, mutta maidontuotantomäärissä ei ollut eroa. Mikroleviä voidaan käyttää lypsylehmien dieetissä täydentämään typen saantia, kun huonolaatuinen karkearehu rajoittaa maidontuotantoa mikrobivalkuaisyynteesin heikentyessä (Quigley



ym. 2009, Panjaitan ym. 2014, Costa ym. 2016). Ureaa on käytetty esimerkiksi Australiassa ei-valkuuistypen (NPN) lähteenä karkearehuun perustuvassa lihanautojen ruokinnassa, mutta se voi mahdollisesti aiheuttaa suurina määrinä myrkytysoireita eläimissä (Panjaitan ym. 2014). Mikrolevän lisääminen lehmien juomaveteen on tehokas keino varmistaa eläinten tasainen typensaanti ja lisätä ohitusvalkuaisen määrää dieetissä (Panjaitan ym. 2010). Myös Chowdhuryn ym. (1995) tutkimuksessa mikrolevää lisättiin vasikoiden juomaveteen, ja seesamiväkirehuun verrattuna mikrolevät paransivat eläinten päiväkasvua ja rehun hyväksikäyttöä. Quigley ym. (2009) raportoivat positiivisista tuloksista juomaveteen sekoitetun *Spirulinan* käytöstä lihanautavasikoiden valkuaisrehuna verrattuna muihin ei-valkuuistypen lähteisiin. *Spirulinan* syöttäminen lypsylehmille 200 g päiväannoksina lisäsi maidontuotantoa ja vaikutti positiivisesti eläinten yleis-terveyteen pitkän 90 päivän ruokintakokeen aikana (Kulpys ym. 2009). Sekä Wullepit ym. (2012) että Moate ym. (2013) havaitsivat tutkimuksissaan runsaasti DHA:ta sisältävän DHA-Gold -mikrolevävalmisteen vähentävän lypsylehmien maidon rasvapitoisuutta, mutta maitomäärässä tai rehunsyönnissä ei todettu merkitseviä muutoksia. Kotrbáček ym. (2015) kirjallisuuskatsauksen mukaan lypsylehmien kasvu ja tuotos paranivat *Chlorella*-ruokinnassa syönnin, rehunkäytön tehokkuuden ja sulavuuden lisääntymisen myötä. Vaikka *Chlorella*-levää annettiin lehmille vain pieniä määriä, mikrolevien ajateltiin todennäköisesti sopivan hyvin märehijöille myös suurina, muita valkuaisrehuja korvaavina annoksina tehokkaan pötsimikrobitoiminnan ansiosta. Ylisen (2015) tutkimuksessa mikroleväruokinta sai aikaan parhaan maitotuotoksen, kun *Spirulinan* ja *Chlorellan* seos korvasi puolet väkirehun rypistä, verrattuna tavanomaiseen rypsi-ruokintaan tai rypsin korvaamiseen kokonaan mikrolevillä.

Boeckert ym. (2008) saivat poikkeuksellisen tuloksen ruokintakokeessa, jossa lehmille annettiin *Schizochytrium*-lajin levärehua suoraan pötsiin. Koelehmien kuiva-aineen syönti putosi lähes puoleen kontrollidieetin syönnistä, kun levää lisättiin rehumassaan 43 g/kg ka. Tämä tulos on ristiriidassa useimpien muiden leväruokintakokeiden kanssa, ja luultavasti muun muassa levälaji ja ruokintatapa ovat vaikuttaneet lopputulokseen voimakkaasti. Jatkotutkimuksessa syönti ja maitotuotos vähenivät noin 10 % kontrollidieetin arvoista, kun samaa mikrolevää annosteltiin väkirehun sekaan 9,35 g/kg ka (Boeckert ym. 2008). Franklinin ym. (1999) tutkimuksessa *Schizochytrium*-mikrolevä vähensi myös kuiva-aineen syöntiä, mutta ei vaikuttanut maitotuotokseen. Mikrolevien rasvahappokoostumuksesta johtuen maito sisälsi vähemmän rasvaa mutta

enemmän tyydyttymättömiä rasvahappoja kuin kontrolliruokinnassa (Franklin ym. 1999). Samanlainen muutos maidon rasvahappokoostumuksessa havaittiin myös Christakin ym. (2012) ruokintakokeessa. Hostens ym. (2011) raportoivat *Schizochytrium*-levää sisältävän DHA-Gold -valmisteeseen lisäävän maitotuotosta mutta vähentävän rasvan osuutta tuotoksessa, kun mikrolevää lisättiin rehuun 110 g/kg päivässä. Rasvahappokoostumus ja maidon rasvapitoisuus muuttuivat Hostensin ym. (2011) ruokintakokeessa samansuuntaisesti Franklinin ym. (1999) ja Boeckartin ym. (2008) tutkimustulosten kanssa.

Mikrolevärehun koostumuksen vaihtelu tuotantomenetelmien, tuotanto-olosuhteiden ja levälajikkeiden mukaan on haaste ruokintastandardien määrittämiselle. Kotieläinten ja erityisesti lypsylehmien mikrolevien käyttöä tutkivien ruokintakokeiden määrä on vielä vähäinen, joten luotettavia johtopäätöksiä ei pystytä tekemään suppean materiaalin ja vaihtelevien tutkimustulosten perusteella (Holman ja Malau-Aduli 2013), eikä mikroleväruokinnasta ole kovin vahvaa näyttöä käytännön maataloustoiminnassa. Ruokintakokeissa levärehun lisäksi esimerkiksi eläinrodun ja kontrolliruokinnan koostumuksen vaikutus lopputulokseen voi olla huomattavan suuri (Holman ja Malau-Aduli 2013).

Tuloksiltaan vaihtelevan tutkimustiedon lisäksi mikrolevien rehukäytön yleistymistä hidastavat sen kalliit tuotantokustannukset, alhainen saatavuus ja nykyisten ruokintamenetelmien rutiininomaisuus. Vaikka mikrolevät voivat edistää sekä eläinten tuottavuutta että terveyttä, niiden käyttö ei ole kannattavaa, jos tuotannon tehostuminen ei riitä kattamaan korkeampia rehukuluja (Belay ym. 1996, Kuhad ym. 1997, Becker 2007, Costa ym. 2016).

Mikrolevien tuotanto ja rehukäyttö voidaan yhdistää osaksi suurempaa kokonaisuutta, jossa hyödynnetään monin tavoin mikrolevien ominaisuuksia. Mikrolevämassan uutaminen biopolttoaineeksi muodostaa sivutuotteena vähärasvaista, runsaasti valkuaisista sisältävää materiaalia, joka soveltuu koostumukseltaan erinomaisesti eläinten ruokintaan (Dismukes ym. 2008, Lum ym. 2013, Kaukovirta-Norja ym. 2015). Tällä menetelmällä pystytään säästämään raaka-aineita ja hyödyntämään aineiden kierrätystä tuotantoalojen välillä (Drewery ym. 2012, Gill 2012).

### 3 Tutkimuksen tavoitteet

Tämä tutkimus oli osa yhteistyössä Cursor Oy:n kanssa toteutettua projektia ”Algae Foods – Levän uudentyypinen hyödyntäminen”, joka oli osittain Euroopan aluekehitysrahaston (EAKR:n) ja Raisioagro Oy:n rahoittama. Projektissa selvitettiin mikrolevien tuotantoa ja käyttöä lypsylehmien ruokinnassa suomalaisissa olosuhteissa. Aiheesta ei ollut vielä ennen tätä projektia kotimaista tutkimustietoa tai käytännön kokemusta, joten ruokintakokeessa kartoitettiin alustavasti mikrolevien sopivuutta rehuseoksiin ja korvaamaan muita valkuaisrehuja. Projektin tavoitteena oli tutkia mahdollisuuksia parantaa kotimaisen valkuaisrehun tuotantoa ja omavaraisuutta mikrolevärehun avulla.

Tutkimuksen tavoitteena oli määrittää kolmen eri mikrolevän (*Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* ja *Nannochloropsis gaditana*) soveltuvuutta lypsylehmien ruokintaan. Tässä tutkielmassa keskitytään perinteisen valkuaisenlähteen soijarouheen korvaamiseen mikrolevillä lypsylehmien dieetissä ja selvitetään sen vaikutusta syöntiin, maitotuotokseen ja maidon koostumukseen, aminohappojen saantiin ja käyttöön maitorauhasessa sekä plasman metaboliitteihin.

Tutkimushypoteesina oli, että mikrolevien käyttäminen lehmien ruokinnassa voi vähentää kuiva-aineen syöntiä tavanomaisia rehuja huonomman maittavuuden sekä erityisesti *Nannochloropsiksen* sisältämien pitkäketjuisten rasvahappojen takia. Toisen tutkimushypoteesin mukaan maito- ja valkuaisuotoksen ei pitäisi muuttua merkittävästi koeruo- kintojen välillä, koska soijan ja mikrolevien aminohappokoostumukset ovat lähellä toisiaan. Kolmantena hypoteesina histidiinin oletettiin rajoittavan maidontuotantoa välttämättömistä aminohapoista eniten.

## 4 Aineisto ja menetelmät

Ruokintakoe toteutettiin Helsingissä Viikin opetus- ja tutkimustilalla 14.6.2014-5.9.2014. Tutkimus koostui neljästä kolmen viikon mittaisesta jaksosta, joissa jokaisessa kahta totutusviikkoa seurasi yksi keruuviikko, eli näytteidenotto suoritettiin toisen viikon lopulta lauantaista kolmannen viikon perjantaihin. Ruokintakoe oli kolmas ja viimeinen osa levätutkimusten sarjaa, jotka suoritettiin Viikin koetilalla syksyn 2013 ja syksyn 2014 välillä.

Tutkimukseen valittiin neljä useamman kerran poikinutta ayrshire-rotuista lypsylehmää, joiden edellisestä poikimisesta oli keskimäärin 112 päivää, keskihajonnan ollessa 21,6 päivää. Koelehmien elopaino oli kokeen alkaessa keskimäärin 652 kg (keskihajonta 79,5 kg) ja lopussa 636 kg (keskihajonta 29,5 kg). Kokeen alussa koelehmien kunto-luokka oli keskimäärin 2,72 (keskihajonta 0,38) ja kokeen lopussa 2,76 (keskihajonta 0,07). Koemallina käytettiin 4x4 latinalaista neliötä, jossa neljä koelehmää kävi läpi neljän jakson aikana neljä erilaista koedieettiä. Tutkimuksen ajan koelehmät olivat kyt-kettyinä navetan parsiosastossa.

### 4.1 Rehujen koostumus

Koelehmien ruokinnat erosivat toisistaan jokaisessa tutkimusjaksossa väkirehun valkuaislisän suhteen. Kaikki ruokinnat olivat valkuaisruokinnan osalta isonitrogeenisia, eli soijarouheesta ja mikrolevistä saatavan raakavalkuaisen määrä oli sama. Kaikissa ruokinnoina väkirehuruokinnan perustana oli pelletöity ohrasta, kaurasta, melassileikkeestä ja seosmelassista koostuva vilja-leikeseos (A-Rehu Oy, Seinäjoki, Suomi). Kontrollidieetissä valkuaisrehuna oli pellettimuotoinen soijatiiviste (A-Rehu Oy, Seinäjoki, Suomi). Taulukossa 1 on lueteltu vilja-leikeseoksen ja taulukossa 2 soijatiivisteen rehuaineet ja niiden suhteet valmistajan tuoteselosteen mukaan.

Taulukko 1. Vilja-leikeseoksen rehuainekoostumus ilmakeivässä rehussa.

	Pitoisuus seoksessa, %
Ohra	36,0
Ohrarehu	31,0
Kaura	20,0
Melassileike	9,0
Seosmelassi	4,0

Taulukko 2. Soijatiivisteiden rehuainekoostumus ilmakeivässä rehussa.

	Pitoisuus seoksessa, %
Soijaruuhe	83,3
Melassileike	11,7
Seosmelassi	5,0

Varsinaisissa koedieeteissä soijaruuheen korvasi yksi kolmesta erilaisesta mikrolevä-jauheesta, *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* tai *Chlorella vulgariksen* ja *Nannochloropsis gaditanan* 1:1-seos. Levärehut tilattiin hollantilaiselta toimittajalta (Duplaco BV-Zyfyto, Hengalo, Hollanti), ja ne olivat laadultaan elintarvikekelpoisia. Kokeeseen valituista mikrolevistä *Spirulina*-jauhe oli valmistettu Kiinassa, *Chlorella* Etelä-Koreassa ja *Nannochloropsis* Hollannissa. Mikrolevät oli kuivattu valmistusvaiheessa jauheeksi korkean kuiva-ainepitoisuuden ja siten myös suuren ravintoainepitoisuuden saavuttamiseksi. Leväjauheet oli pakattu ilmatiiviisti muovisäkkeihin ja valolta suojaviin pahvilaatikoihin ja niitä säilytettiin kylmiössä, jotta ympäristön olosuhteet eivät muuttaisi levien kemiallisia ja aistinvaraisia ominaisuuksia.

Dieetit tasapainotettiin koostumukseltaan ja ravintoarvoiltaan mahdollisimman lähelle toisiaan. Lehmien päivittäinen väkirehuannos oli 12,5 kg. Koeväkirehut tasapainotettiin ensin raakavalkuaisen saannin eli valkuaistäydennysrehujen suhteen, minkä jälkeen rehuannokseen lisättiin 300 g kivennäisseosta (Pihatto-Melli Plus, Raisioagro Oy, Raisio, Suomi) sekä tarvittava määrä vilja-leikerehua painoltaan vakioksi määritetyn väkirehuannoksen aikaansaamiseksi. Leväruokinnoissa päivittäinen väkirehuseos sisälsi 1,2 kg *Spirulinaa*, 1,4 kg *Chlorellaa* tai 1,7 kg *Chlorellan* ja *Nannochloropsiksen* seosta (0,85 kg + 0,85 kg). Soijapelletin melassileike- ja melassipitoisuutta kompensoitiin levädieeteissä lisäämällä väkirehuseokseen vastaava määrä melassileikettä ja seosmelassia.

Koelehmät saivat väkirehun lisäksi vapaasti nurmisäilörehua. Timotei-nurminatarehu oli korjattu edellisenä kesänä (2.8.2013) Viikin opetus- ja tutkimustilan pelloilta toisesta sadosta. Esikuivattu nurmisäilörehu oli korjattu pyöröpaaleihin, ja rehun säilönnässä oli käytetty muurahaishappopohjaista säilöntäainetta (AIV 2 Plus, Kemira, Helsinki, Suomi) 6 L/tn rehua.

#### 4.2 Ruokinnan toteutus

Jokainen neljästä koelehmästä sai vuorollaan neljää erilaista koerehua, joiden valkuaistenlähteenä oli *Spirulina*, *Chlorella* tai *Chlorellan* ja *Nannochloropsiksen* seos tai kontrolliruokinnan soijatiiviste. Koeruokinnat on esitetty taulukossa 3, jossa ruokinnat on merkitty seuraavasti: soija, Spir = *Spirulina*, Chlor = *Chlorella*, Chlor + Nanno = *Chlorellan* ja *Nannochloropsiksen* seos.

Taulukko 3. Koeruokinnat lehmittäin ja jaksoittain.

Koejakso	Lehmän numero			
	1	2	3	4
I	soija	Spir	Chlor	Chlor + Nanno
II	Spir	Chlor	Chlor + Nanno	soija
III	Chlor + Nanno	soija	Spir	Chlor
IV	Chlor	Chlor + Nanno	soija	Spir

Säilörehua annettiin koelehmille vapaasti siten, että rehujäännös oli noin 5 % annetusta rehumäärästä. Tämä mahdollisti eläimille kohtuullisen rehun valikoinnin mutta piti rehujätteen määrän vähäisenä. Uutta säilörehua otettiin syöttöön kolme kertaa viikossa, kahdelle tai perjantaisin kolmelle seuraavalle päivälle. Ennen ruokintaa pyöröpaalit avattiin ja hienonnettiin rehusekoittimessa (CutMix, Pellon Group, Ylihärmä, Suomi). Säilörehu kerättiin rehukärryihin, joita säilytettiin navetan kylmiössä seuraavaan rehun-tekoon asti. Kokeen loppupuolella, 8.8.2014 alkaen, säilörehun sekaan lisättiin hienon-  
nusvaiheessa 6,5 L hanaveteen laimennettua propionihappoa (suhde 1:12) pyöröpaalia kohden. Tämän tarkoituksena oli estää säilörehuruokinnan yhteydessä lämpimällä säällä havaittua rehun lämpenemistä ja laadun heikkenemistä.

Säilörehu jaettiin käsin koelehmien vaa'allisiin RIC-rehukuppeihin (Roughage Intake Control, Insentec, Marknesse, Hollanti) kolme kertaa päivässä. Säilörehujätteet kerättiin pois joka aamu ennen ensimmäistä säilörehunjakoa. Säilörehua jaettiin edellisten päivien syöntien mukaan kerrallaan noin 20-25 kiloa yhtä lehmää kohti klo 9.00, 13.30 ja 18.00.

Päivittäiset väkirehuannokset sekoitettiin ruokintaa edeltävänä päivänä ja säilytettiin huoneenlämmössä. Viljaleike- ja melassileikepelletit sekä kontrollidieetin soijatiiviste punnittiin rehuvaalla (ITB 60K10DLIPM, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Saksa) 10 g:n tarkkuudella ja sekoitettiin keskenään. Levädieettien muut komponentit, eli mikroleväjauheet sekä kivennäisseos, punnittiin analyysivaa'lla (XT6200C, Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Sveitsi) 10 mg:n tarkkuudella. Jauheiden sekaan lisättiin siirapimainen melassiseos. Mikroleväseos sekoitettiin lopuksi rakeisten rehujen joukkoon sen jälkeen, kun pelletit oli kostutettu kauttaaltaan vedellä (noin 750 ml). Näin pyrittiin varmistamaan leväjauheiden tarttumisen pellettien pinnalle, jotta väkirehuannoksen koostumus olisi tasainen eivätkä jauhemuotoiset rehut kasaantuisi astian pohjalle. Kontrollidieetissä kivennäisseos annosteltiin suoraan lehmien karkearehukaukaloon säilörehun päälle väkirehun jaon yhteydessä.

Väkirehut jaettiin viisi kertaa päivässä yhtä suurina noin 2,5 kg:n annoksina klo 6.00, 10.30, 14.30, 17.00 ja 19.30. Väkirehuseos annettiin koelehmille erillisistä väkirehukaukaloista, jotka nostettiin eläinten ulottuville ruokinta-aikaan säilörehukupin päälle. Väkirehukaukalot poistettiin lehmien edestä, kun kaikki väkirehu oli syöty tai lehmä ei selkeästi enää ollut kiinnostunut väkirehusta.

Koeruokintojen vaihtuessa keruuviikon jälkeen ruokintaseosten koostumuksia muutettiin vaiheittain totutusviikkojen aikana. Väkirehuannoksesta vähennettiin 15 % edellisen jakson valkuaisrehua ja lisättiin 15 % uutta valkuaisrehua, kunnes seitsemäntenä päivänä viimeisen 10 % muutoksen jälkeen väkirehuannos koostui kokonaan uudesta väkirehuruokinnasta. Levärehujen asteittaisen lisäämisen tarkoitus oli antaa koe-eläimille aikaa sopeutua uuden rehun koostumukseen ja makuun ennen täyden leväannoksen syöttämistä. Ruokintojen rakenne-eroja ja lehmien harjoittamaa väkirehun valikoimista pyrittiin estämään valmistamalla väkirehuseoksesta mahdollisimman tasalaatuinen massa. Tavoitteena oli saada koelehmät syömään joka kerta koko väkirehuannos, jotta mikrole-

väruokinnan vaikutus saataisiin suunnitellusti havainnollistettua eläinten aineenvaihdunnassa.

### **4.3 Syöinti ja maidontuotanto**

Säilörehun syöintiä seurattiin ruokintakupin vaa'an avulla 10 g:n tarkkuudella. Lehmille käsin annostellun säilörehun paino kirjattiin ylös jokaisella jakokerralla. Säilörehua lisättiin kaukaloon päivän aikana edellisen rehun päälle, kun jäännösrehun määrä oli ensin kirjattu vaa'asta. Jäännösrehu poistettiin kokonaan joka aamu ennen ensimmäistä säilörehunjakoa, ja edellisen päivän lehmäkohtainen säilörehunsyöinti laskettiin annetun säilörehumäärän ja jäännösrehun perusteella.

Väkirehun syöinti ja mahdollisen väkirehujäännöksen määrä kirjattiin ylös päivittäin. Totutusviikoilla syömättömän väkirehun määrä arvioitiin silmämääräisesti. Keruuvii-kolla väkirehujäännös punnittiin rehuvaa'alla ja kirjattiin lehmäkohtaisesti ylös.

Koelehmät lypsettiin päivittäin klo 6.00 ja 17.00 putkilypsykoneella (Delaval, Tumba, Ruotsi), ja maitomäärä kirjattiin ylös jokaisella lypsykerralla maitomittarista (WB Auto Sampler, Tru-Test, Auckland, Uusi-Seelanti).

### **4.4 Näytteidenotto ja analysointi**

Keruuviiikon aikana kaikilta koelehmiltä otettiin sonta-, veri- ja maitonäytteitä, ja eläimet punnittiin ennen ja jälkeen tutkimuksen. Myös lehmien ruokintaan käytetyistä säilö- ja väkirehuista kerättiin näytteitä rehun koostumuksen määrittämiseksi. Kaikki näytteet analysoitiin Helsingin yliopiston Maataloustieteiden laitoksen kotieläintieteen laboratoriossa, lukuun ottamatta maitonäytteitä, jotka analysoitiin Valion Seinäjoen aluelaboratoriossa.



#### 4.4.1 Elopaino ja kuntoluokitus

Koelehmät punnittiin navetan eläinvaa'alla (CV 9600 Scale, Solotop Oy, Helsinki, Suomi) ennen kokeen alkamista ja sen päätyttyä. Elopaino määritettiin kahden peräkkäisen päivän tuloksen keskiarvona. Eläimen painon poiketessa yli 10 kg peräkkäisinä päivinä punnittiin kyseinen lehmä vielä seuraavana päivänä kunnes punnitustulokset olivat alle 10 kg:n etäisyydellä toisistaan. Koelehmät kuntoluokitettiin kokeen alussa ja lopussa Edmonsonin ym. (1989) kuntoluokitusasteikon mukaisesti.

#### 4.4.2 Maitonäytteet

Maitomäärän kirjaamisen lisäksi keruuviikolla maitomittariin kertynyt maito kerättiin näytepulloon neljän peräkkäisen lypsykerran yhteydessä tiistai-illasta lähtien. Maidon koostumusanalyysiä varten maitoa kaadettiin pikareihin, joissa oli Bronopol-säilöntäainepilleri (Valio Oy, Helsinki, Suomi). Lypsykertakohtaisista maitonäytteistä analysoitiin rasva-, valkuais-, laktoosi- ja ureapitoisuus infrapuna-analysaattorilla (Milco Scan FT 6000, Foss, Hillerød, Tanska).

#### 4.4.3 Sontanäytteet

Sontanäytteet kerättiin keruuviikolla neljänä peräkkäisenä päivänä maanantaista torstaihin aamuisin klo 7.00 ja iltapäivisin klo 15.30. Jokaiselta lehmältä kerättiin noin 5 dl sontaa tuoreena spot-näytteenä. Kaikki näytteet kerättiin jaksoittain lehmäkohtaisiin sankoihin, joita säilytettiin pakastimessa. Keruuviikon jälkeen jakson aikana kerätyt sontanäytteet sulatettiin ja sekoitettiin huolellisesti tasaiseksi seokseksi. Primäärisen kuiva-aineen määrittystä varten sontanäytteitä kuivattiin lämpökaapissa (Memmert, Memmert GmbH, Schwabach, Saksa) 20-24 tunnin ajan 103 °C:ssa. Kuiva-aine laskettiin alkuperäisen näytteen ja kuivatun näytteen painon erotuksena. Analyysinäytettä varten sontanäytteitä kuivattiin kuivauskaapissa ensin 1 tunnin ajan 103 °C:ssa ja sen jälkeen 2 vuorokautta 70 °C:ssa. Kuivatut analyysinäytteet jauhettiin sakomylyssä (KT-3100, Koneteollisuus Oy, Helsinki, Suomi) 1,5 mm seulan läpi hienoksi jauheeksi. Jauheesta määritettiin sekundäärinen kuiva-aine kuivaamalla näytettä lämpökaapissa 103 °C:ssa 17 tunnin ajan. Tuhkan määrä selvitettiin polttamalla näytteitä muhveliunissa

(Heraeus Thermicon T, Heraeus, Hanau, Saksa) 600 °C:ssa 20-24 tunnin ajan. Neutraalidetergenttikuidun (NDF) määrittämisessä toimitettiin Van Soestin ym. (1991) menetelmän mukaan käyttäen kuuma- ja kylmäuuttolaitetta (Tecator Fibertec System 1020/1021, Foss, Hillerød, Tanska). Happoon liukenemattoman tuhkan (AIA) pitoisuus määritettiin Van Keulenin ja Youngin (1977) mukaan.

#### 4.4.4 Verinäytteet

Keruuviikon viimeisenä päivänä lehmillä otettiin verinäyte kolmesti päivässä klo 5.30, 8.30 ja 11.30 häntä- ja maitosuonesta. Yhdellä näytteenottokerralla kummastakin suonesta otettiin erikseen kolme 10 ml vakuumputkellista (Vacuette, Geiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Itävalta) verta. Kahdessa näyteputkessa veren hyytymistä estävänä tekijänä oli tri-kalium-etyleenidiamiinitetraetikkahappo (K3-EDTA) ja yhdessä litium-hepariini. Näyteputket siirrettiin välittömästi näytteenoton jälkeen jäämurskaan. Näytteitä sentrifugoitiin huoneenlämmössä 10 minuutin ajan g-arvona 2220 (Type 4-15, B. Braun, Melsugen, Saksa). Näytteistä määritettiin näytteenottohetkittäin glukoosi, vapaat rasvahapot (NEFA) ja  $\beta$ -hydroksivoihappo (BHBA). Niiden määrittämisessä käytettiin samaa analysointilaitetta (KONE Pro Selective Chemistry Analyzer, Thermo Electron Oy, Vantaa, Suomi) ja erilaisia kittejä, jotka olivat glukoosille Glucose GOD-POD kit (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Suomi), NEFA:lle NEFA-HR(2) kit (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Saksa) ja BHBA:lle Ranbut kit (Randox Laboratories, Crumlin, Iso-Britannia). Näytteenottopäivittäin ja lehmittäin yhdistetyistä verinäytteistä selvitettiin insuliinin (RIA kit, PI-12K, Millipore Oy, Espoo, Suomi), etikkahapon ja aminohappojen pitoisuudet (molemmat nestekromatografilla (Waters Acquity UPLC, Waters, kolonni 186004097, Waters MassTrak AAA, Waters)).

#### 4.4.5 Säilörehunäytteet

Jokaisesta säilörehuerästä otettiin edustava keräilynäyte välittömästi paalien silppuamisen jälkeen kolme kertaa viikossa säilörehunteon yhteydessä. Näytteestä määritettiin navetan laboratoriossa primäärinen kuiva-ainepitoisuus kuivaamalla rehua lämpökaapissa 103 °C:ssa 20-24 tunnin ajan. Lisäksi säilörehun puristenesteestä määritettiin pH-arvo elektronisella pH-mittarilla (S20 SevenEasy™ pH, Mettler-Toledo Ltd, Leicester,

Iso-Britannia). Keruuviikolla säilörehusta otettiin keräilynäyte jokaisen rehunjaon yhteydessä, ja yhden päivän näytteet (yhteensä noin 1 kg) suljettiin muovipussiin ja pakastettiin.

Keruuviikolla kerätyt ja pakastetut säilörehunäytteet sulatettiin ja yhdistettiin jaksoittain analysointia varten. Näytteet kuivattiin lämpökaapissa (103 °C, noin 24 h), ja primääri-nen kuiva-ainepitoisuus määritettiin alkuperäisen ja kuivatun näytteen painoeron perusteella. Kuivatusta säilörehusta jauhettiin analyysinäyte KT-sakomyllissä käyttäen 1 mm seulaa. Sekundäärisen kuiva-aineen, tuhkan, raakavalkuaisen ja NDF:n määrittämisessä meneteltiin vastaavasti kuin sontanäytteiden kohdalla käyttäen samoja menetelmiä ja laitteita. Säilörehun käymislaatumäärittäykseen kuuluivat maitohappo Barkerin ja Summersonin (1941) kolorimetrisen menetelmän mukaan (Shimadzu UV-VIS mini 1240, Shimadzu Europa GmbH) ja haihtuvat rasvahapot (VFA) nestekromatografilla (Waters Acquity UPLC, Waters) ja Waters MassTrak AAA-kolonnilla (186004097, Waters). Pelkistävät sokerit (Somogyi 1945, Salo 1965), ammoniumtyppi (McCullough 1967) ja etanoli (entsyymikitti cat. No 176290, R-Biopharm AG, Darmstadt, Saksa) määritettiin myös spektrofotometrillä (Shimadzu UV-VIS mini 1240, Shimadzu Europa GmbH). *In vitro*-sellulaasisulavuus määritettiin pepsiini-sellulaasi -menetelmän (Friedel 1990) muunnelmalla (Nousiainen ym. 2003). AIA:n ja iNDF:n pitoisuudet selvitettiin sontanäytteiden tapaan Van Keulenin ja Youngin (1977) ja Ahvenjärven ym. (2000) menetelmillä. Aminohappomäärittäystä varten näytteet hydrolysoitiin Korhosen ym. (2002b) ja direktiivin 98/64/EC (European Commission, 1998) mukaan ja analysoitiin UPLC-nestekromatografilla (Waters Acquity UPLC, Waters; Puhakka ym. 2016).

#### 4.4.6 Väkirehunäytteet

Keruuviikolla jokaisesta väkirehukomponentista otettiin joka päivä erilliset näytteet koostumuksen määrittäystä varten. Koko viikon näytteet kerättiin rehlajeittain muovipusseihin. Levärehunäytteitä säilytettiin kylmiössä, muita rehuja huoneenlämmössä. Muista jaksokohtaisesti analysoiduista väkirehunäytteistä poiketen kivennäisseosta kerättiin koko tutkimuksen ajan samaan näytopussiin ja koostumus (kuiva-aine, tuhka ja AIA) määritettiin vasta tutkimuksen lopuksi. Keruuviikolla koelehmien mahdolliset

väkirehujätteet punnittiin ja kerättiin talteen lehmäkohtaisesti kuiva-ainemääritystä varten.

Jakson päätyttyä rehunäytteiden primäärinen kuiva-ainepitoisuus määritettiin säilörehunäytteiden tapaan. Analyysinäytteitä varten pellettimuotoiset rehut jauhettiin 1 mm seulan läpi KT-sakomyllyssä. Mikrolevärehujen, vilja-leikeseoksen, soijatiivisteiden ja mellassileikkeen analyysinäytteistä määritettiin sekundäärinen kuiva-aine, tuhka, raakavalkuainen, NDF, AIA, iNDF ja aminohapot käyttäen samoja menetelmiä kuin sonta- ja säilörehunäytteille. Lisäksi selvitettiin väkirehujen kokonaisrasvapitoisuus HCl-hydrolyysin ja petroolieetteriuuton avulla (FOSS Soxtec 8000 uuttoyksikkö, SoxCap 2047 hydrolyysiyksikkö, FOSS Analytical, Hillerød, Tanska). Seosmelassista analysoitiin tuhka, raakavalkuainen ja AIA. Kivennäisseoksesta määritettiin tuhka ja AIA.

#### 4.5 Tulosten laskenta

Säilörehun primäärisen kuiva-aineen korjaus suoritettiin Huidan ym. (1986) mukaan. Säilörehun orgaanisen aineen sulavuus muutettiin *in vivo* -sulavuutta vastaavaksi *in vitro* -sulavuustuloksista käyttäen Huhtasen ym. (2006) korjausyhtälöitä. Energiakorjattu maito (EKM) laskettiin Sjaunjan ym. (1990) mallin mukaan. Plasman virtaus maitorauhaseen laskettiin Cantin ym. (1993) mukaisesti Fickin sääntöä käyttäen. Maitorauhasen ravintoaineidenotto laskettiin Halmemies-Beauchet-Filleau'n ym. (2013) mukaan. Maitorauhasen aminohappojen otto-eritys -suhde laskettiin Lapierrin ym. (2012) mukaan.

Tulokset analysoitiin käyttämällä SAS-ohjelmiston (versio 9.3, SAS Institute Inc., Cary, Yhdysvallat) Mixed-proseduurin varianssianalyysiä. Tilastoinnissa koeruokinta ja jakso olivat kiinteitä muuttujia ja eläin satunnaismuuttujia. Syönnissä typen saannin analysointiin käytettiin neliömuunnosta, jotta se olisi normaalijakautunut. Isoleusiinin pitoisuus valtimoveressä korjattiin normaalijakautuneeksi käyttämällä neliömuunnosta ja jakamalla tulos sadalla. Plasman BHBA:n pitoisuuksissa arvoihin tehtiin logaritminen muunnos. Aminohappojen otto-eritys -suhdetta laskettaessa leusiinin arvoihin käytettiin neliömuunnosta.

Tilastollisessa analyysissä käytettiin ortogonaalisia kontrasteja, joissa vertailtiin 1) soijaa ja kaikkia mikroleviä, 2) *Spirulina* ja *Chlorella*-ruokintoja ja 3) *Chlorella* ja *Chlorellan* ja *Nannochloropsis*in seosta. Tulosten tilastollista merkitsevyyttä kuvattiin P-arvolla, jossa  $P < 0,001$  tarkoittaa erittäin merkitsevää,  $P < 0,01$  hyvin merkitsevää,  $P < 0,05$  merkitsevää ja  $P < 0,10$  suuntaa-antavaa eroa koeruokintojen välillä.

Ruokintakokeen aikana yksi koelehmistä poistettiin tutkimuksesta yleiskunnon huonontumisen ja vähäisen syönnin takia. Huonokuntoisuuden saattoivat vaikuttaa monet syyt, kuten utaretulehdus, jalkavaivat ja mahdollisesti levärehun soijarehua huonompi maittavuus. Tästä johtuen tuloksista puuttuu kaksi havaintoa, yksi *Spirulina*- ja yksi *Chlorella*-ruokinnasta. Taulukoissa soija- ja *Chlorella-Nannochloropsis* -ruokintojen SEM-arvo (Standard Error of the Mean) saadaan kertomalla 0,8306 *Spirulina*- ja *Chlorella*-ruokintojen taulukoissa raportoitu SEM.

## 5 Tulokset

### 5.1 Rehujen koostumus

Säilörehun ja väkirehuseosten komponenttien koostumustiedot on esitetty taulukossa 4. Säilörehun D-arvo eli sulavan orgaanisen aineen osuus oli 656 g/kg kuiva-aineessa. Säilörehun pH oli 4,24. Kuiva-aineessa sokereita oli 136 g/kg, maitohappoa 27,2 g/kg, etikkahappoa 6,8 g/kg, propionihappoa 0,8 g/kg ja voihappoa 0,2 g/kg. Ammoniumtyypen osuus kokonaistypestä oli 19,6 g/kg.

Valkuaisrehuista mikrolevien kuiva-ainepitoisuudet olivat suurempia kuin soijatiivistein. Kuiva-aineen osuus oli suurin *Nannochloropsis*-levässä. Samoin tuhkan määrä kuiva-aineessa oli selkeästi suurin *Nannochloropsiksessa* muihin mikroleviin ja soijaan verrattuna. NDF:n määrä oli suurin soijassa, lähes kaksinkertainen *Nannochloropsikseen* verrattuna. *Spirulinassa* ja *Chlorellassa* ei ollut lainkaan NDF:ää. Sekä raakarasvan että raakavalkuaisen määrä oli mikrolevissä suurempi kuin soijassa, ja pitoisuudet vaihtelivat paljon eri levälajien välillä.

Sekä välttämättömien että ei-välttämättömien aminohappojen pitoisuus oli suurempi soijavalkuaisessa kuin yhdessäkään mikrolevävalkuaisessa. Aminohappojen osuus raakavalkuaisesta oli valkuaisrehuissa pienin *Chlorellassa*. Välttämättömien aminohappojen pitoisuudet raakavalkuaisessa vaihtelivat paljon soijan ja eri mikrolevien välillä, aiheuttaen eroja aminohappojen saantiin koeruokintojen välillä. Yleensä maidontuotantoa rajoittavista välttämättömistä aminohapoista histidiinin ja lysiinin pitoisuudet olivat suurimmat soijavalkuaisessa, mutta metioniinipitoisuus oli mikrolevävalkuaisessa noin kaksinkertainen soijaan verrattuna.

Taulukko 4. Säilörehun ja väkirehujen koostumus.

	Säilörehu	Vilja-leikeseos	Melassileike	Seosmelassi	Soijatiiviste	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Nannochloropsis</i>
Kuiva-aine %	27,7	90,0	87,9	70,6	87,8	94,6	94,8	96,2
Kuiva-aineessa, %								
Tuhka	8,17	3,43	6,68	10,3	7,55	7,18	5,14	15,8
NDF <sup>1</sup>	49,6	36,2	33,9		14,5	0,00	0,00	7,68
Raakasva		4,72	0,29		1,10	5,16	12,3	19,2
Raakavalkuainen	13,5	12,2	11,2	8,13	43,9	69,7	58,6	38,5
Raakavalkuaisessa, g/kg								
Aminohapot yhteensä	746	886	746	370	1003	930	854	890
Haaraketjuiset <sup>2</sup>	154	149	145	50,4	173	193	160	168
Ei-välttämättömät	385	513	381	272	532	439	439	464
Välttämättömät	362	372	365	97,7	470	416	416	427
Arginiini	36,5	56,4	39,6	5,40	78,6	80,4	58,0	62,0
Fenyylialaniini	44,4	45,7	34,0	6,60	55,3	50,8	45,3	44,8
Histidiini	16,4	22,0	27,6	3,30	27,4	17,7	18,3	17,6
Isoleusiini	36,8	34,0	37,1	17,8	46,1	52,0	32,6	38,9
Leusiini	68,3	66,2	57,7	17,8	79,9	83,4	78,9	79,1
Lysiini	45,5	35,6	53,3	4,00	62,4	36,0	59,5	55,2
Metioniini	11,8	9,70	10,0	13,9	9,80	22,9	20,8	19,4
Treoniini	39,7	36,0	40,6	6,30	43,1	50,6	38,8	44,8
Tryptofaani	13,9	18,6	14,7	7,80	20,5	12,5	15,6	14,3
Valiini	48,5	48,2	50,1	14,9	47,0	57,8	48,1	50,4

<sup>1</sup>Neutraalidetergenttikuitu<sup>2</sup>Isoleusiini, leusiini ja valiini

## 5.2 Syönti ja ravintoaineiden sulavuus

Rehujen syöntiä, ravintoaineiden saantia ja niiden sulavuutta koskevat tulokset on esitetty taulukossa 5. Säilörehun syönti lisääntyi mikroleväruokinnassa verrattuna soijaan ( $P < 0,05$ ). *Chlorellan* ja *Chlorella-Nannochloropsis* -seoksen vertailussa lehmät söivät säilörehua merkitsevästi enemmän ( $P < 0,05$ ), kun dieetissä oli kahden mikrolevän seosta. Väkirehun osuus kaikesta syödystä rehusta oli numeerisesti suurin soijaruokinnassa ja pienin ruokinnan sisältäessä *Chlorella-Nannochloropsis* -seosta. Mikroleväruokinnat pienensivät väkirehun osuutta koko syödystä rehumäärästä suuntaa-antavasti ( $P < 0,10$ ), ja *Chlorella*-ruokintaan verrattuna *Nannochloropsis*in lisääminen rehuseokseen pienensi väkirehun suhdetta säilörehuun nähden lähes suuntaa-antavasti ( $P = 0,13$ ).

Orgaanisen aineen, NDF:n ja typen saanti oli samanlaista koeruokintojen välillä. Syöty rehu sisälsi hieman enemmän orgaanista ainetta ( $P < 0,01$ ) ja suuntaa-antavasti enemmän raakavalkuaista ( $P < 0,10$ ) *Chlorella*-ruokinnassa kuin *Chlorella-Nannochloropsis* -ruokinnassa. Koeruokinnat eivät vaikuttaneet ravintoaineiden näennäiseen sulavuuteen ( $P > 0,10$ ).

Aminohappojen saanti rehusta vaihteli paljon ruokintojen välillä valkuaisrehujen aminohappokoostumuksesta riippuen. Ei-välttämättömien ja kaikkien aminohappojen yhteenlaskettu saanti oli suuntaa-antavasti suurempaa ( $P < 0,10$ ) soijadieetissä mikrolevädietteihin nähden. Haaraketjuisten aminohappojen saanti oli suuntaa-antavasti pienempää ( $P < 0,10$ ) *Chlorella*-ruokinnoissa kuin *Spirulina*-ruokinnassa. Välttämättömien aminohappojen saanti oli pääsääntöisesti suurempaa soijaruokinnassa kuin mikroleväruokinnoissa, mikä näkyi tilastollisesti merkitsevästi erona arginiinin ja histidiinin saannissa ( $P < 0,01$ ) ja suuntaa-antavana erona ( $P < 0,10$ ) fenyylialaniinin, isoleusiinin ja tryptofaamin saanneissa. Numeerisesti aminohappojen saanti oli *Spirulina*-ruokinnassa suurempaa kuin *Chlorella*- ja *Chlorella-Nannochloropsis* -ruokinnoissa. *Spirulina*in valkuaisen suurempi aminohappopitoisuus muihin mikroleviin verrattuna ilmeni tilastollisesti hyvin merkitsevästi erona ( $P < 0,01$ ) arginiinin ja isoleusiinin saannissa, merkitsevästi erona ( $P < 0,05$ ) fenyylialaniinin ja treoniinin kohdalla sekä suuntaa-antavana erona ( $P < 0,10$ ) valiinin saannissa, kun *Spirulinaa* verrattiin *Chlorella* sisältäviin ruokintoihin. Sen sijaan *Chlorella*- ja *Chlorella-Nannochloropsis* -ruokintojen välillä aminohappojen saannissa ei ollut eroja. Metioniinin saanti eri ruokinnoissa oli päinvastaista muihin aminohappoihin verrattuna, sillä soijaruokinnassa metioniinin saanti oli pienempää ( $P < 0,01$ ) kuin mikroleväruokinnoissa. Metioniinin saanti oli numeerisesti suurinta *Spirulina*-ruokinnassa, ja ero *Chlorella*-ruokintoihin oli suuntaa-antava ( $P = 0,10$ ). Lysiinin



saanti oli numeerisesti suurinta soijaruokinnassa ja pienintä *Spirulina*-ruokinnassa, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

Taulukko 5. Kuiva-aineen (ka) syönti, ravintoaineet syödyssä rehussa ja ravintoaineiden sulavuus.

	Koeruokinta				SEM	Merkitsevyys		
	Soija	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i> + <i>Nannochloropsis</i>		Soija vs. mikro- levät	<i>Spirulina</i> vs. <i>Chlorellat</i>	<i>Chlorella</i> vs. <i>Chlorella</i> + <i>Nannochlorop- sis</i>
Havainnot	4	3	3	4				
Syönti								
Säilörehun ka, kg/pv	10,6	12,9	10,9	12,8	0,51	0,034	0,156	0,045
Dieetin ka, kg/pv	21,5	22,0	20,9	21,6	1,29	0,973	0,383	0,501
Orgaaninen aine, kg/pv	19,9	20,4	19,4	19,9	1,21	0,944	0,375	0,574
NDF <sup>1</sup> , kg/pv	8,82	9,32	8,55	9,09	0,450	0,552	0,193	0,200
Typpi (N), g/pv <sup>2</sup>	283 (530)	292 (539)	273 (516)	271 (517)	34,0	0,718	0,247	0,966
Aminohapot, g/pv								
Yhteensä	2835	2751	2604	2607	187,9	0,083	0,194	0,977
Haaraketjuiset <sup>3</sup>	520	534	489	497	34,1	0,398	0,070	0,707
Ei-välttämättömät	1536	1461	1397	1395	103,5	0,060	0,291	0,971
Välttämättömät	1299	1290	1207	1213	84,6	0,134	0,113	0,905
Arginiini	176	172	154	149	12,1	0,007	0,008	0,374
Fenyylialaniini	157	155	145	145	9,7	0,035	0,047	0,958
Histidiini	69,2	61,6	60,0	59,0	4,27	0,004	0,301	0,651
Isoleusiini	127	130	112	115	7,7	0,066	0,009	0,445
Leusiini	234	236	223	225	15,7	0,437	0,214	0,834
Lysiini	154	135	143	146	10,7	0,133	0,305	0,796
Metioniini	35,3	45,1	42,1	41,5	2,96	0,005	0,100	0,766
Treoniini	130	137	123	126	8,2	0,497	0,017	0,509
Tryptofaani	56,2	50,7	51,1	49,8	3,64	0,038	0,920	0,614
Valiini	160	168	154	157	10,7	0,998	0,076	0,725
Väkirehun osuus ka:sta, %	51,1	40,8	47,7	39,7	0,04	0,054	0,471	0,121
Ravintoaineet syödyssä rehussa, g/kg ka								
Orgaaninen aine	926	926	928	923	0,7	0,162	0,602	0,003
Raakavalkuainen	154	153	154	150	1,5	0,164	0,704	0,078
NDF <sup>1</sup>	408	425	408	426	8,6	0,186	0,412	0,138
Näennäinen kokonaissulavuus, %								
Kuiva-aine	65,1	64,1	65,0	65,1	1,27	0,777	0,501	0,916
Orgaaninen aine	65,9	65,0	66,1	66,1	1,27	0,860	0,440	0,973
NDF <sup>1</sup>	47,4	50,3	49,1	51,6	2,45	0,241	0,992	0,428
Typpi	61,7	60,2	60,9	60,6	1,61	0,500	0,776	0,886

Koekäsittelyissä Soija ja *Chlorella* + *Nannochloropsis* SEM pitää kertoa luvulla 0,8306.

<sup>1</sup>Neutraalidetergenttikuitu

<sup>2</sup>Tilastollisessa analyysissä käytetty tyyppästä toiseen potenssiin korotettuja ja tuhannella jaettuja arvoja normaalijakauman saavuttamiseksi, alkuperäiset arvot merkitty sulkuihin.

<sup>3</sup>Isoleusiini, leusiini ja valiini

### 5.3 Maidontuotanto ja maidon koostumus

Maitotuotoksissa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja (taulukko 6,  $P > 0,10$ ), mutta tuotos oli numeerisesti hieman suurempi mikroleväruokinnossa verrattuna soija-ruokintaan. *Spirulina*-ruokinnassa energiakorjattu maitotuotos oli yli kolme kiloa enemmän kuin muissa dieeteissä, mutta ei kuitenkaan tilastollisesti merkitsevästi. Rasva-, valkuais- ja laktoosituotokset olivat myös *Spirulina*-dieetissä numeerisesti suurimmat ja soijadieetissä kaikkein pienimmät. Rasvatuotos oli suuntaa-antavasti suurempi *Spirulina*-ruokinnassa kuin *Chlorella* sisältävissä ruokinnossa ( $P < 0,10$ ). Mikroleväruokinta lisäsi maidon rasvapitoisuutta suuntaa-antavasti ( $P < 0,10$ ) soijaan verrattuna, ja rasvapitoisuus oli merkitsevästi suurempi *Spirulina*-ruokinnassa *Chlorella*-ruokintoihin verrattuna ( $P < 0,05$ ). Rehun hyväksikäyttö maidontuotantoon oli numeerisesti tehokkaampaa mikroleväruokinnossa kuin soijaruokinnassa, mutta tilastollisesti ero ei ollut merkitsevä ( $P = 0,19$ ).

Taulukko 6. Maitotuotos ja maidon koostumus.

	Koeruokinta				SEM	Merkitsevyys		
	Soija	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i> + <i>Nanno-</i> <i>chloropsis</i>		Soija vs. mikro- levät	<i>Spirulina</i> vs. <i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i> vs. <i>Chlorella</i> + <i>Nanno-</i> <i>chloropsis</i>
Havainnot	4	3	3	4				
Maitotuotos								
Maito, kg/pv	29,7	32,1	29,9	30,8	1,86	0,517	0,459	0,715
EKM <sup>1</sup> , kg/pv	29,3	33,9	30,0	30,5	2,02	0,290	0,165	0,822
Rasva, g/pv	1215	1484	1261	1287	98,2	0,186	0,098	0,818
Valkuainen, g/pv	952	1043	957	969	61,5	0,468	0,227	0,849
Laktoosi, g/pv	1320	1427	1324	1360	95,5	0,614	0,487	0,776
Koostumus								
Rasva, %	4,10	4,50	4,14	4,22	0,157	0,073	0,028	0,475
Valkuainen, %	3,22	3,22	3,16	3,15	0,134	0,612	0,540	0,946
Laktoosi, %	4,45	4,43	4,44	4,42	0,049	0,753	0,914	0,804
Urea, mg/dL	23,9	20,0	24,1	22,0	2,90	0,484	0,357	0,542
Ureatyyppi, mg/dL	12,3	8,52	12,0	10,4	2,261	0,471	0,475	0,662
EKM <sup>1</sup> / ka:n syönti, kg/pv	1,37	1,55	1,48	1,43	0,130	0,188	0,320	0,624

Koekäsittelyissä Soija ja *Chlorella* + *Nannochloropsis* SEM pitää kertoa luvulla 0,8306.

<sup>1</sup>Energiakorjattu maitotuotos

#### 5.4 Plasman aineenvaihduntatuotteet

Plasman aineenvaihduntatuotteissa oli useita merkitseviä eroja koeruokintojen välillä (taulukko 7). Plasman virtaus suhteessa tuotettuun maitomäärään antoi viitteitä plasman virtauksen pienenemisestä mikroleväruokinnoissa ( $P=0,12$ ). Maitotuotoksen ollessa hieman suurempi mikroleväruokinnoissa soijaruokintaan verrattuna, ero plasman virtauksessa oli vielä selvempi suhteutettuna päivittäiseen maitotuotokseen. Plasman etikkahappopitoisuus oli suuntaa-antavasti pienempi ( $P<0,10$ ) soijadieetissä kuin mikrolevädieeteissä. *Spirulina*-ruokinta lisäsi etikkahapon pitoisuutta valtimoveressä *Chlorella*-ruokintoihin verrattuna ( $P<0,01$ ). Plasman insuliinipitoisuus oli merkitsevästi suurempi soija- kuin mikroleväruokinnoissa ( $P<0,05$ ). *Spirulina*-ruokintaan verrattuna *Chlorella* sisältävät ruokinnat vähensivät plasman insuliinipitoisuutta ( $P<0,01$ ), ja *Nannochloropsis*in lisääminen *Chlorella*-ruokintaan vähensi insuliinipitoisuutta edelleen suuntaa-antavasti ( $P<0,10$ ). NEFA:n pitoisuus valtimoveressä oli suuntaa-antavasti ( $P<0,10$ ) pienempi soijaruokinnassa kuin mikroleväruokinnassa. Numeerisesti plasman NEFA-pitoisuudet olivat lähes kaksinkertaisia leväruokinnassa (0,254, 0,194 ja 0,197 mmol/L) verrattuna soijaruokintaan (0,113 mmol/L), ja erityisesti *Spirulina* näytti lisäävän plasman NEFA-pitoisuutta, mutta erot eivät olleet tarpeeksi suuria ollakseen tilastollisesti merkitseviä.

Etikkahapon valtimon ja laskimon pitoisuuserotus oli merkitsevästi suurempi syötettäessä *Spirulinaa* verrattuna *Chlorellaan* ( $P<0,05$ ) ja suuntaa-antavasti suurempi mikroleväruokinnoissa kuin soijaruokinnassa ( $P<0,10$ ). BHBA:n pitoisuuserotus suureni *Spirulina*-ruokinnassa verrattuna *Chlorella* sisältäviin ruokintoihin ( $P<0,10$ ), ja glukoosin pitoisuuserotus oli suuntaa-antavasti ( $P<0,10$ ) suurempi *Chlorella*-ruokinnassa kuin *Chlorellan* ja *Nannochloropsis*in seosta annettaessa. NEFA:n valtimo-laskimo -erotus oli hyvin lähellä nollaa kaikissa ruokinnoissa, soijaruokinnassa numeerisesti hieman negatiivisempi kuin mikroleväruokinnoissa ( $P=0,12$ ).

NEFA:n otto (%) plasmasta maitorauhaseen oli negatiivista kaikissa ruokinnoissa, mutta soijaruokinnassa osuus oli merkitsevästi negatiivisempi (-39 %) verrattuna mikroleväruokintoihin (-10, -4,1 ja -14 %) ( $P<0,05$ ). Maitorauhasen etikkahapon otto valtimoverestä oli merkitsevästi pienempää soijaruokinnassa kuin mikroleväruokinnoissa ( $P<0,05$ ), ja *Chlorellaan* verrattuna *Spirulina* lisäsi maitorauhasen etikkahapon ottoa hyvin merkitsevästi ( $P<0,01$ ). NEFA:n suhteen koeruokinnat vaikuttivat maitorauhasen

ottoon samansuuntaisesti kuin valtimo-laskimo -erotukseen, eli soijaruokinnassa maitorauhasen otto oli numeerisesti selvästi negatiivisempi kuin mikroleväruokinnoissa, mutta ero ei ollut tilastollisesti aivan suuntaa-antava ( $P=0,12$ ).

Taulukko 7. Plasman aineenvaihduntatuotteet veressä.

	Koeruokinta				SEM	Merkitsevyys		
	Soija	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i> + <i>Nannochloropsis</i>		Soija vs. mikrolevät	<i>Spirulina</i> vs. <i>Chlorellat</i>	<i>Chlorella</i> vs. <i>Chlorella</i> + <i>Nannochloropsis</i>
Havainnot	4	3	3	4				
Plasman virtaus, L/pv	12778	12135	12286	12280	1067,2	0,477	0,867	0,995
Plasman virtaus, L/kg maitoa	430	370	400	399	25,4	0,111	0,278	0,975
Pitoisuudet valtimossa								
Etikkahappo, mmol/L	1,25	2,62	1,47	1,36	0,212	0,055	0,009	0,706
logBHBA, mmol/L <sup>1</sup>	1,86 (0,768)	2,20 (2,07)	2,00 (1,03)	1,94 (0,871)	0,124	0,208	0,189	0,744
Glukoosi, mmol/L	3,63	3,40	3,56	3,62	0,136	0,438	0,294	0,732
Insuliini, µIU/ml	13,5	13,4	11,1	9,11	1,131	0,018	0,009	0,062
NEFA, mmol/L	0,113	0,254	0,194	0,197	0,0775	0,060	0,276	0,963
Valtimo-laskimo -erotus, mmol/L								
Etikkahappo	0,654	1,41	0,814	0,812	0,2176	0,062	0,023	0,994
logBHBA <sup>1</sup>	1,30 (0,211)	1,69 (0,709)	1,29 (0,184)	1,32 (0,209)	0,131	0,379	0,073	0,889
Glukoosi	0,783	0,847	0,905	0,792	0,0524	0,161	0,973	0,085
NEFA	-0,036	0,038	0,009	-0,004	0,0368	0,118	0,312	0,718
Maitorauhasen otto, %								
Etikkahappo	47,1	60,1	50,8	59,3	11,61	0,254	0,585	0,425
logBHBA <sup>1</sup>	3,44 (28,0)	3,48 (30,3)	3,30 (25,2)	3,38 (24,1)	0,120	0,667	0,372	0,629
Glukoosi	21,7	25,1	25,4	22,1	2,14	0,238	0,589	0,240
NEFA	-38,7	-10,0	-4,06	-14,5	16,050	0,038	0,954	0,454
Maitorauhasen otto, mol/pv								
Etikkahappo	8,72	16,5	10,4	10,3	2,42	0,021	0,007	0,898
logBHBA <sup>1</sup>	2,40 (2,70)	2,74 (9,44)	2,35 (1,97)	2,40 (2,58)	0,142	0,544	0,104	0,809
Glukoosi	10,1	10,0	10,8	9,74	1,184	0,904	0,854	0,469
NEFA	-0,478	0,616	0,098	-0,025	0,4988	0,113	0,236	0,805

Koekäsittelyssä Soija ja *Chlorella* + *Nannochloropsis* SEM pitää kertoa luvulla 0,8306.

<sup>1</sup>Tilastollisessa analysissä BHBA:n arvoista tehty logaritminen muutos, alkuperäiset arvot merkitty sulkuihin.

## 5.5 Plasman aminohapot

Kaikkien aminohappojen yhteenlaskettu pitoisuus plasmassa ei eronnut tilastollisesti ruokintojen välillä. Numeerisesti aminohappopitoisuus oli suurin *Spirulina*-ruokinnassa (3003 µmol/L) ja hieman pienempi soija-, *Chlorella*- ja *Chlorella-Nannochloropsis* -ruokinnoissa (2873, 2857 ja 2844 µmol/L) (taulukko 8). Välttämättömien aminohappojen valtimopitoisuudessa ainoa tilastollisesti havaittu suuntaa-antava ero ( $P < 0,10$ ) oli tryptofaanin pienempi pitoisuus mikroleväruokinnoissa verrattuna soijaruokintaan. Valtimoveren histidiinipitoisuus oli numeerisesti suurin soijaruokinnassa, ja lysiiniä ja metioniinia oli numeerisesti eniten *Spirulina*-ruokinnassa.

Taulukko 8. Aminohappojen valtimopitoisuus (µmol/L) plasmassa.

	Koeruokinta				SEM	Merkitsevyys		
	Soija	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i> + <i>Nannochloropsis</i>		Soija vs. mikrolevät	<i>Spirulina</i> vs. <i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i> vs. <i>Chlorella</i> + <i>Nannochloropsis</i>
Havainnot	4	3	3	4				
Aminohapot yhteensä	2873	3003	2857	2844	119,2	0,821	0,350	0,937
Haaraketjuiset <sup>1</sup>	621	748	695	651	75,1	0,325	0,414	0,645
Ei-välttämättömät	1741	1739	1685	1731	101,4	0,832	0,808	0,740
Välttämättömät	1131	1251	1160	1113	90,9	0,634	0,319	0,689
Arginiini	87,5	83,7	75,9	83,8	9,30	0,298	0,584	0,325
Fenyylialaniini	56,8	58,8	54,0	53,5	3,28	0,704	0,272	0,909
Histidiini	63,4	52,3	56,9	45,5	7,12	0,137	0,901	0,249
Isoleusiini <sup>2</sup>	219	491	287	302	118,2	0,244	0,190	0,919
	(147)	(207)	(167)	(173)				
Leusiini	156	188	180	158	21,9	0,420	0,506	0,481
Lysiini	107	116	109	102	9,1	0,889	0,397	0,590
Metioniini	24,5	25,9	20,9	21,7	2,76	0,574	0,232	0,830
Treoniini	129	123	109	117	9,5	0,241	0,420	0,549
Tryptofaani	41,5	40,5	36,4	39,1	1,14	0,062	0,114	0,143
Valiini	318	352	347	319	29,7	0,469	0,584	0,472

Koekäsittelyissä Soija ja *Chlorella* + *Nannochloropsis* SEM pitää kertoa luvulla 0,8306.

<sup>1</sup>Isoleusiini, leusiini ja valiini

<sup>2</sup>Tilastollisessa analyysissä käytetty isoleusiinista toiseen potenssiin korotettuja ja sadalla jaettuja arvoja normaalijakauman saavuttamiseksi, alkuperäiset arvot merkitty sulkuihin.

Taulukossa 9 on esitetty aminohappojen otto plasmasta maitorauhaseen (mmol/pv). Aminohappojen kokonaisotto maitorauhaseen oli suurinta *Spirulina*-ruokinnassa (8324 mmol/pv), ja ero oli suuntaa-antava ( $P < 0,10$ ) *Chlorella*-ruokintoihin verrattuna. *Chlorella-Nannochloropsis* -ruokinnassa aminohappojen otto maitorauhaseen oli selvästi pienempää ( $P < 0,05$ ) kuin *Chlorella*-ruokinnassa, ja haaraketjuisten ja välttämättömien aminohappojen otto oli myös suuntaa-antavasti pienempää *Chlorella-Nannochloropsis*-ruokinnassa ( $P < 0,10$ ). Yksittäisistä välttämättömistä aminohapoista arginiinin otto oli suurempaa soijaruokinnassa kuin mikroleväruokinnoissa ( $P < 0,05$ ), ja *Chlorella*-ruokinnoissa se oli vielä pienempää kuin *Spirulina*-ruokinnassa ( $P < 0,05$ ). Tryptofaanin otto oli sen sijaan suurempaa mikroleväruokinnoissa kuin soijaruokinnassa ( $P < 0,05$ ). Valiinin otto oli merkitsevästi suurempaa ( $P < 0,05$ ) ja leusiinin otto suuntaa-antavasti suurempaa ( $P < 0,10$ ) *Chlorella*-ruokinnassa verrattuna *Chlorella-Nannochloropsis* -seosta sisältäneeseen ruokintaan. Koeruokinnat eivät vaikuttaneet maitorauhasen histidiiniin, lyysiiniin ja metioniiniin ottoon, mutta otto oli numeerisesti suurinta näiden aminohappojen suhteen *Spirulina*-ruokinnassa.

Aminohappojen otto-eritys -suhde (g/g) vaihteli hieman koeruokintojen välillä (taulukko 9). Suhde oli arginiinin kohdalla suurempi soijaruokinnassa kuin mikroleväruokinnoissa ( $P < 0,05$ ). Fenyylialaniinin ja valiinin otto-eritys -suhde oli suuntaa-antavasti ( $P < 0,10$ ) pienempi *Spirulina*-ruokinnassa kuin *Chlorella*-ruokinnoissa. Leusiinin suurempi suhde *Chlorella*-ruokinnassa kuin *Chlorella-Nannochloropsis* -ruokinnassa sekä tryptofaanin suurempi suhde mikroleväruokinnoissa kuin soijaruokinnassa olivat tilastollisesti suuntaa-antavia ( $P < 0,10$ ). Tulosten perusteella aminohappojen erityis oli ottoa suurempaa (suhde alle 1) metioniinin ja tryptofaanin kohdalla kaikissa ruokinnoissa sekä fenyylialaniinin kohdalla *Spirulina*-ruokinnassa. Histidiiniin, lyysiiniin ja metioniiniin otto-eritys -suhteet olivat hyvin samankaltaiset eri koeruokinnoissa.

Taulukko 9. Aminohappojen otto (mmol/pv) maitorauhaseen ja välttämättömien aminohappojen otto-eritys -suhde (g/g) maitorauhasessa.

	Koeruokinta				SEM	Merkitsevyys		
	Soija	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i> + <i>Nanno-</i> <i>chloropsis</i>		Soija vs. mikro- levät	<i>Spirulina</i> vs. <i>Chlorellat</i>	<i>Chlorella</i> vs. <i>Chlorella</i> + <i>Nanno-</i> <i>chloropsis</i>
Havainnot	4	3	3	4				
Otto maitorauhaseen, mmol/pv								
Aminohapot yhteensä	7852	8324	8314	7448	436,0	0,320	0,075	0,014
Haaraketjuiset <sup>1</sup>	2223	2149	2497	2114	158,6	0,786	0,280	0,051
Ei-välttämättömät	3232	3621	3409	3000	377,2	0,633	0,182	0,229
Välttämättömät	4620	4686	4889	4448	229,6	0,704	0,917	0,067
Arginiini	560	544	481	492	33,7	0,035	0,049	0,651
Fenylylalaniini	293	313	306	300	17,3	0,371	0,551	0,761
Histidiini	195	197	195	193	15,5	0,981	0,879	0,924
Isoleusiini	605	559	676	562	59,1	0,907	0,345	0,142
Leusiini	818	837	900	796	45,7	0,425	0,755	0,055
Lysiini	752	796	796	721	52,7	0,706	0,549	0,294
Metioniini	163	186	167	172	11,3	0,285	0,228	0,728
Treoniini	396	415	376	394	31,5	0,969	0,409	0,631
Tryptofaani	37,9	66,7	52,2	60,5	7,73	0,014	0,171	0,291
Valiini	800	757	924	756	65,2	0,752	0,132	0,027
Maitorauhasen otto-eritys -suhde, g/g								
Arginiini	2,86	2,61	2,54	2,47	0,106	0,032	0,440	0,610
Fenylylalaniini	1,00	0,98	1,03	1,01	0,015	0,878	0,068	0,254
Histidiini	1,13	1,03	1,13	1,09	0,064	0,520	0,347	0,677
Isoleusiini	1,37	1,16	1,50	1,25	0,117	0,576	0,182	0,151
Leusiini <sup>2</sup>	1,26	1,07	1,47	1,14	0,115	0,758	0,110	0,060
	(1,12)	(1,04)	(1,21)	(1,06)				
Lysiini	1,35	1,29	1,42	1,27	0,080	0,811	0,566	0,193
Metioniini	0,87	0,90	0,88	0,89	0,023	0,340	0,731	0,779
Treoniini	1,09	1,04	1,03	1,07	0,030	0,188	0,730	0,394
Tryptofaani	0,56	0,89	0,73	0,84	0,122	0,065	0,444	0,487
Valiini	1,45	1,18	1,58	1,34	0,106	0,486	0,095	0,154

Koekäsittelyissä Soija ja *Chlorella* + *Nannochloropsis* SEM pitää kertoa luvulla 0,8306.

<sup>1</sup>Isoleusiini, leusiini ja valiini

<sup>2</sup>Tilastollisessa analyysissä käytetty leusiinista toiseen potenssiin korotettuja arvoja normaalijakauman saavuttamiseksi, alkuperäiset arvot merkitty sulkuihin.



Ruokinnat vaikuttivat hieman aminohappojen valtimo-laskimo -erotukseen ( $\mu\text{mol/L}$ ) (taulukko 10 liitteenä). Tryptofaanin erotus oli suurempi mikroleväruokinnoissa kuin soijaruokinnassa ( $P<0,05$ ). Arginiinin erotus oli suuntaa-antavasti suurempi *Spirulina*-ruokinnassa kuin *Chlorella*-ruokinnoissa ( $P<0,10$ ), ja valiinin erotus oli suuntaa-antavasti suurempi *Chlorella*-ruokinnassa verrattuna *Chlorella-Nannochloropsis* -ruokintaan ( $P=0,10$ ). Histidiinin, lysiinin ja metioniinin valtimo-laskimo -erotus oli numeerisesti suurempi mikroleväruokinnoissa kuin soijaruokinnassa, lukuun ottamatta lysiinin pienintä erotusarvoa *Nannochloropsisista* sisältävässä ruokinnassa.

Maitorauhasen aminohappojen ottotehokkuus (%) erosi merkitsevästi metioniinin suhteen ( $P<0,01$ ), ollen mikroleväruokinnoissa selvästi suurempi (63,9, 70,2 ja 65,3 %) kuin soijaruokinnassa (55,4 %) (taulukko 10 liitteenä). Pääsääntöisesti aminohappojen ottotehokkuus valtimoverestä oli numeerisesti suurempaa mikroleväruokinnoissa kuin soijadieetissä. Tilastollisesti tämä ero oli metioniinin lisäksi merkitsevän suuri tryptofaanin suhteen ( $P=0,01$ ) sekä suuntaa-antava ei-välttämättömien aminohappojen suhteen ( $P<0,10$ ).

## 6 Tulosten tarkastelu

### 6.1 Koerehujen koostumus

Ravitsemukselliselta laadultaan kokeessa käytetty karkearehu oli enintään keskinkertaista. D-arvon 656 g/kg ka perusteella säilörehu oli kohtalaisen sulavaa ottaen huomioon pötsin toiminnan ja ravintoaineiden hyödyntämisen. Huhtasen ym. (2007) mukaan säilörehu, jonka D-arvo on alle 640 g/kg, vähentää energiansaantia ja rajoittaa tuotosta rehun suuren kuitupitoisuuden ja orgaanisen aineen pienen osuuden takia. Säilönnän onnistumista kuvaavat arvot, kuten kuiva-ainepitoisuus (27,7 %), ammoniumtypen määrä kokonaistypestä (19,6 g/kg), ja happopitoisuus (maitohappoa 27,2 g/kg, etikkahappoa 6,8 g/kg, propionihappoa 0,8 g/kg, voihiappoa 0,2 g/kg) olivat hyvällä tasolla. Jos mikrobikäyminen on säilönnän aikana ollut liian voimakasta, fermentaation seurauksena muodostuvat hapot ja ammoniumtyyppi vähentävät suurina määrinä rehun maittavuutta ja syöntiä (Allen 2000, Huhtanen ym. 2007). Hyvästä säilöntälaadusta huolimatta karkearehu lämpeni korkean ilmanlämpötilan vaikutuksesta nopeasti ruokintatilanteissa tutkimuksen loppupuolella, mitä ehkäistiin lisäämällä rehun sekaan propionihappoa. Vaihtelut säilörehun laadussa eivät kuitenkaan aiheuttaneet muutoksia koelehmien säilörehun syöntiin.

Kaikkien kokeessa käytettyjen mikrolevärehujen kuiva-ainepitoisuus oli suuri, yli 94 %. Tutkimukseen oli alun perin tarkoitus tuottaa mikrolevämassaa Anjalassa Kouvolan seudun ammattiopiston kasvattamalla, mutta levärehun kuiva-ainepitoisuutta ei saatu tarpeeksi suureksi, jotta kuljetus olisi onnistunut ja säilyvyys ja ravintoainepitoisuus olisivat olleet riittävän hyvät.

Koerehujen koostumus vaihteli huomattavasti sekä soijan ja mikrolevien välillä että eri mikrolevälajien välillä. Soijaan verrattuna mikrolevät sisälsivät moninkertaisesti enemmän raakarasvaa (soijassa 1,10 % ka, mikrolevissä 5,16 (*Spirulina*), 12,3 (*Chlorella*) ja 19,2 (*Nannochloropsis*) % ka). Mikrolevät ja muut merestä saatavat rehut sisältävät runsaasti monityydyttymättömiä rasvahappoja, jotka pötsimikrobisto muuttaa tyydyttyneiksi biohydrogenaatioissa (Allen 2000). Prosessiin kuluu energiaa ja vapaat tyydyttymättömät rasvahapot ovat suurina määrinä haitallisia etenkin kuitua sulattaville mikrobeille (McDonald ym. 2011). Märehtijöiden rehustus sisältääkin tyyppillisesti vain vähän

lipidejä. Raakavalkuaispitoisuus oli *Nannochloropsiksen* kohdalla valkuaisrehuista pienin (38,5 % ka), mutta muissa levissä soijaa suurempi (43,9 vs. 69,7 (*Spirulina*) ja 58,6 (*Chlorella*) % ka). Beckerin (2007) mikrolevien koostumusta käsittelevässä julkaisussa *Spirulina platensiksen* valkuaispitoisuus oli 46-63 % ka ja *Chlorella vulgariksen* 51-58 % ka, joten siihen verrattuna tässä tutkimuksessa käytettyjen mikrolevien valkuaispitoisuus oli suuri. Matos ym. (2016) käyttivät mikrolevien valkuaispitoisuuden analysoinnissa tyypelle kerrointa 4,78, kun tyypillisesti typen oletetaan kuvastavan rehun raakavalkuaispitoisuutta kertoimella 6,25. Tällä laskentatavalla Matos ym. (2016) huomioivat mikrolevien NPN-pitoisuuden, joka voi olla 4-40 %. Menetelmästä johtuen Matos ym. (2016) saivat mikroleville tätä tutkimusta ja Beckerin (2007) tuloksia pienemmät valkuaisarvot (*Spirulina* 42,8 %, *Chlorella* 41,4 %) lukuunottamatta *Nannochloropsista* (41,6 %), jonka valkuaispitoisuus oli samalla tasolla *Spirulinan* ja *Chlorellan* kanssa.

NDF:n eli kuidun määrä oli soijatiivistessä 14,5 % ka, mutta näitä soluseinämän aineita ei ollut ollenkaan *Spirulinassa* tai *Chlorellassa*, ja lähes puolet vähemmän *Nannochloropsiksessa* (7,68 % ka). Myöskään Ylisen (2015) ja Tarsian (2016) kokeiden *Spirulina* tai *Chlorella* eivät sisältäneet NDF:ää. Matos ym. (2016) määrittivät *Spirulinan* kokonaiskuidun määräksi 8,5 %, *Chlorellan* 5,6 % ja *Nannochloropsiksen* 14,1 %, mutta kuidun laatua ei eritelty tarkemmin. Vaikka kuidut hajoavat hitaasti märehitijöiden ruoansulatuksessa, ne ovat välttämättömiä pötsin toiminnalle ja ehkäisevät monia ruoansulatusperäisiä terveysongelmia (McDonald ym. 2011). Ruokintojen eroja tasasi kaikkien väkirehuseosten perustana käytetty vilja-leikeseos, joten käytännössä koeväkirehujen koostumuserot jäivät pienemmiksi kuin valkuaisrehujen koostumus antaisi ymmärtää.

Raakavalkuaispitoisuus oli väkirehukomponenteista suurin *Spirulinassa* ja *Chlorellassa* ennen soijatiivistettä, mutta aminohappojen pitoisuus oli silti suurin soijassa. Tämä selittyy mikrolevien suuremmalla ei-valkuaispitoisuuden (NPN) määrällä, joka lasketaan valkuaisiksi mutta ei ole suoraan yhtä käyttökelpoista elimistölle kuin aminohapot. Märehitijöiden pötsimikrobit pystyvät hyödyntämään metaboliassaan myös NPN:ää, joten mikrolevien raakavalkuaispitoisuus saadaan paremmin käyttöön esimerkiksi lehmillä kuin yksimahaisilla. Rehujen aminohappojen jakautuminen välttämättömien ja ei-välttämättömien aminohappojen suhteen vaikuttaa valkuaispitoisuuden tehokkuuteen ja tuottavuuteen elimistössä. Yleisesti histidiini on nurmisäilörehuun ja viljaan perustuvassa ruokinnassa ensimmäisenä tuotantoa rajoittava aminohappo (Vanhatalo ym. 1999). Metioniini ja lysiini voivat myös rajoittaa lypsylehmien maidontuotantoa (Robinson

2010, McDonald ym. 2011). Histidiiniä ja lysiiniä oli enemmän soijavalkuaisessa kuin mikrolevävalkuaisessa, mutta metioniinilähteenä mikrolevät olivat lähes kaksi kertaa parempia. Sojassa metioniinia oli raakavalkuaisessa 9,8 g/kg ja mikrolevissä 19-22 g/kg.

Beckerin (2007) raportoimat aminohappopitoisuudet soijan, *Spirulinan* ja *Chlorellan* suhteen tukevat mikrolevien paremmuutta metioniinilähteenä. Sen sijaan Beckerin (2007) mukaan *Chlorellan* valkuaisessa oli keskimäärin enemmän lysiiniä kuin sojassa, mutta tässä tutkimuksessa *Chlorellan* valkuaisen lysiinipitoisuus jäi hieman soijaa pienemmäksi. Yleisesti lysiinin, histidiinin ja metioniinin osuudet raakavalkuaisesta olivat ruokintakokeen rehuissa pääasiassa pienemmät kuin Beckerin (2007) artikkelissa, mihin voivat vaikuttaa esimerkiksi mikrolevien kasvatusolosuhteet ja rehujen käsittely. Ruokinnassa aminohappojen tasapainoinen saanti tarvetta vastaavasti riippuu kaikkien välttämättömien aminohappojen kokonaisuudesta, joten rehujen on pystyttävä tarjoamaan tarpeeksi kaikkia yhdisteitä. Rehuaineiden puutteita voidaan kompensoida käyttämällä useampaa ainetta sekoituksena, joten esimerkiksi mikrolevälajien seos voisi toimia paremmin aminohappojen lähteenä kuin yksittäiset mikrolevät. Ylisen (2015) ruokintakokeessa käytettyihin levärehuihin verrattuna tässä tutkimuksessa *Spirulina* ja *Chlorella* sisälsivät selvästi enemmän aminohappoja, jopa yli 130 g enemmän kilossa raakavalkuaista. *Spirulina* sisälsi Tarsian (2016) mukaan enemmän lysiiniä kuin tässä ruokintakokeessa, mutta vähemmän metioniinia ja histidiiniä.

## 6.2 Syönti ja ravintoaineiden sulavuus

Koelehmien kuiva-aineen syönti oli lähes samansuuruista kaikissa koeruokkinnoissa, mutta säilörehun ja väkirehun suhteessa oli eroja. Tutkimushypoteesin mukaan mikroleväruokinta saattaa vähentää syöntiä, ja tulosten perusteella lehmät söivät levää sisältäviä väkirehuja vähemmän kuin soijapohjaista väkirehua. Kokonaissyöntiin tällä ei ollut kuitenkaan suurta vaikutusta, koska koelehmät kompensoivat huonommin maittavaa leväväkirehua lisäämällä säilörehun syöntiä. Lehmät söivät säilörehua kohtalaisen hyvin, 10,6-12,9 kg ka/pv, vaikka nurmisäilörehu oli korjattu toisesta sadosta, joka vaikuttaa yleensä syöntiä ja maitotuotostavasteita vähentävästi verrattuna ensimmäisen sadon nurmisäilörehuun (Kuoppala ym. 2010). Tavoitteena oli saada lehmät syömään kaikki

tarjottava väkirehu, mutta oli myös oletettavaa, että mikroleville ominaiset aistinvaraiset ominaisuudet, kuten tavanomaisista rehuista poikkeava *Nannochloropsis* kalaisa aromi, ja jauheinen koostumus vaativat lehmiltä totuttelua. Mikrolevien huono maittavuus on vähentänyt kokonaissyöntiä esimerkiksi Franklinin ym. (1999), Boeckertin ym. (2008) ja Moaten ym. (2013) tutkimuksissa, joissa koelehmät eivät ole kompensoineet syöntiä ja kuiva-aineen saantia syömällä enemmän muita rehuja.

Numeerisesti tarkasteltuna väkirehun osuus dieetin kuiva-aineesta oli selvästi lähimpänä soijaruokintaa (51,1 %) *Chlorella*-ruokinnassa (47,7 %). Sen sijaan *Spirulinan* ja *Chlorella-Nannochloropsis* -seoksen kohdalla (40,8 % ja 39,7 %) väkirehun huonompi maittavuus näkyi säilörehun syönnin suurempana osuutena. Kuiva-aineen päivittäiset kokonaissyöntimäärät olivat koeruokinnossa melko tasaisesti 1,1 kg:n sisällä huolimatta eroista väkirehujen syönnissä. Kokonaisuutena kuiva-aineen syönti oli dieettien välillä päinvastaista kuin väkirehujen syönti, sillä *Spirulina*- ja *Chlorella-Nannochloropsis* -dieeteissä päivittäinen kuiva-aineen syönti oli numeerisesti hieman suurempi kuin soija- ja *Chlorella*-dieeteissä. Syödyn rehuannoksen orgaanisen aineksen, NDF:n ja typhen pitoisuudet olivat samankaltaisia kaikissa koeruokinnossa, joten esimerkiksi NDF:n puuttuminen *Spirulina*- ja *Chlorella*-mikrolevistä ei aiheuttanut suuria koostumuseroja ruokintojen välillä säilörehun kompensoivan vaikutuksen ansiosta.

Tämän tutkimuksen perusteella mikrolevälajien maittavuudessa on eroja, ja rehuvalinnoilla voidaan mahdollisesti vaikuttaa väkirehun osuuteen dieetissä. Dreweryn ym. (2012) mukaan mikrolevien maittavuus riippuu paljon rehustuksen muista komponenteista ja ruokintatavasta. Rehujen vertailussa maittavuus oli huono, kun mikroleviä syötettiin yksinään tai nesteeseen sekoitettuna, ja paras väkirehusekoituksessa muun muassa puuvillansiementen ja mäskin kanssa (Drewery ym. 2012). Ylisen (2015) tutkimuksessa rypsiä korvannut *Spirulina-Chlorella* -seos ei vaikuttanut syöntiä vähentävästi. Tarsian (2016) ruokintakokeessa rypsin tai härkävun osittainen vaihtaminen *Spirulina*-rehuun seosrehuruokinnassa vähensi kuiva-aineen syöntiä, mutta lehmien energiansaanti pysyi siitä huolimatta samalla tasolla kaikissa ruokinnossa. Moaten ym. (2013) mukaan levärehun käsittely ja säilytys voivat vaikuttaa syöntiin, koska ilmankosteus ja suora auringonvalo edesauttavat lipidimolekyylien lipolyysiä ja hapettumista, mikä aiheuttaa voimakasta kalanhajua rehuun. Maittavuutta vähentävien reaktioiden estämiseksi sekä tässä että Moaten ym. (2013) tutkimuksessa mikrolevärehut säilytettiin ilmatii- viesti viileässä lämpötilassa. Kotrbáčekin ym. (2015) mukaan *Chlorella* parantaa rehun

maittavuutta ja syöntiä, kun sen pitoisuus rehuannoksessa on hyvin pieni, esimerkiksi vain 1 %. Tässä tutkimuksessa koelehmät söivät eniten *Chlorellaa* muihin mikroleviin verrattuna, mutta maittavuus ei parantunut soijaan nähden. Maittavuuden huononeminen Kotrbáčekin ym. (2015) havaintojen vastaisesti oli todennäköisesti seurausta mikrolevien suuresta pitoisuuserosta väkirehuruokinnassa. Yleensä rehun suuri raaka-alkuainepitoisuus parantaa kuiva-aineen syöntiä, etenkin kun rehun aminohappokoostumus vastaa hyvin eläimen tarvetta (Allen 2000), mutta mikrolevärehun lisääminen valkuaispitoisuuden lisäämiseksi voi vähentää syöntiä muiden maittavuuteen vaikuttavien ominaisuuksien takia. Kokonaissyönnin ylläpitäminen korkealla tasolla vaatii riittävän laadukkaan säilörehun tarjoamisen lypsylehmille, jos väkirehun syönti vähenee mikrolevärehun takia. Koelehmien keskimääräinen elopaino oli hieman alhaisempi kokeen lopussa kuin alussa (652 kg vs. 636 kg), mikä voi olla seurausta pienemmästä energian saannista lehmien korvatessa väkirehunsyöntiä säilörehulla.

Syöntitottumukset näyttävät vaihtelevan yksilöllisesti lehmien välillä. Neljällä lehmällä aloitettu ja lopulta vain kolmella lehmällä loppuun suoritettu ruokintakoe mahdollisti sen, että yksittäisten lehmien suhtautuminen mikroleväruokintaan vaikutti tavallista voimakkaammin lopputuloksiin ja tilastolliseen tulkintaan. Kokeen aikana yksi neljästä koelehmästä vähensi selkeästi väkirehun syöntiään mikroleväruokinnoissa, mutta muut kolme lehmää eivät huomattavasti reagoineet mikrolevän lisäämiseen väkirehun sekaan. Suuremmalla koe-eläinten määrällä tulokset voisivat olla paremmin yleistettävissä, mutta toisaalta tämän tutkimuksen lehmien erilainen suhtautuminen mikrolevärehuihin antaa realistisen tuloksen hypoteesinakin mainituista maittavuusongelmista leväruokinnassa.

Rehun ravintokoostumuksen lisäksi ruokintatapa voi vaikuttaa levien aistinvaraisiin ominaisuuksiin ja edelleen syöntiin. Tässä tutkimuksessa leväjauhe sekoitettiin kosteaan väkirehuun mahdollisimman tasaisesti, mutta ongelmina olivat esimerkiksi levän kasaantuminen ruokintakupin pohjalle ja perinteisistä väkirehuista poikkeava jauheinen rakenne. Aikaisemmissa tutkimuksissa mikroleviä on syötetty muun muassa juomaveden (Panjaitan ym. 2010, Panjaitan ym. 2014) ja seosrehun (Tarsia 2016) mukana. Leväjauheen sisällyttäminen väkirehuseokseen pelletöintivaiheessa voisi tasoittaa rehun koostumusta ja vähentää lehmien harjoittamaa rehun valikointia, edellyttäen että prosessointi ei huononna ravintoaineiden laatua. Ruokintatapa on voinut olla oleellinen tekijä tässä tutkimuksessa havaittuun lehmien huonon väkirehun syönnin kompensointiin säi-

lörehun syöntiä lisäämällä, koska eläimille tarjottiin erikseen levää sisältävää väkirehua ja tavanomaista säilörehua. Esimerkiksi Tarsian (2016) ruokintakokeessa syönti väheni, kun *Spirulina*-jauhetta lisättiin seosrehuun, eikä koelehmillä ollut vaihtoehtoa syödä maittavampaa levätöntä rehua. Kuiva-aineen syöntiin vaikuttavat lukuisat eri tekijät, joten erityisesti uusien rehuaineiden vaikutusta syöntiin on vaikea arvioida.

Orgaanisen aineen pitoisuus dieetissä pieneni korvattaessa puolet *Chlorellasta Nannochloropsiksella*, johtuen *Nannochloropsiksen* muita mikroleviä suuremmasta tuhkapitoisuudesta, mutta numeerisesti erot koeruokintojen välillä olivat hyvin pieniä. NDF:n suurempi pitoisuus *Spirulina*- ja *Chlorella-Nannochloropsis* -dieeteissä soija- ja *Chlorella*-dieetteihin nähden selittyy todennäköisesti suuremmalla säilörehun osuudella koko syönnistä, sillä pelkästään mikrolevien NDF-pitoisuudella ei näytä olevan merkittävää vaikutusta syödyn rehuannoksen NDF-pitoisuuteen.

Aminohappojen hieman suurempi saanti soijaruokinnassa verrattuna mikroleväruokintoihin vastaa rehujen aminohappokoostumuksessa havaittua eroa soijan ja mikrolevien välillä. Pattonin ym. (2014) esittämään lypsylehmien aminohappojen tarpeeseen verrattuna lehmät saivat tässä tutkimuksessa riittävästi histidiiniä ja hieman liian vähän lysiiniä. Metioniinia koelehmät saivat eniten mikrolevistä, mutta tarpeeseen nähden liian vähän (Patton ym. 2014). Tämän perusteella metioniini on voinut olla maidontuotantoa ensimmäisenä rajoittava aminohappo, eikä histidiini, kuten tutkimushypoteesina oletettiin.

Rehujen koostumuksen lisäksi valkuaisen pötsihajoavuus voi vaikuttaa aminohappoaineenvaihduntaan elimistössä (Korhonen ym. 2002c). Esimerkiksi *Spirulinan* (Costa ym. 2016) ja härkäpavun (Puhakka ym. 2016) suuri pötsihajoavuus tehostaa mikrobivalkuaisen tuotantoa. Myös säilörehun ja viljojen valkuainen hajoaa yleensä nopeasti pötsissä (Korhonen ym. 2002c). Valkuaiseruokinnassa tavoitellaan tasapainoa pötsissä mikrobien ravinnoksi hajoavan ja hajoamattomana ohutsuoleen siirtyvän valkuaisen välille niin, että pötsimikrobien toiminta on tehokasta ja toisaalta ohutsuoletta imeytyvät aminohapot vastaavat eläimen tarvetta. Pattonin ym. (2014) mukaan ohutsuoletta imeytyvistä aminohapoista yleensä noin 30-45 % on peräisin pötsissä hajoamattomasta valkuaisesta. Näin ollen rehun aminohappokoostumus ei vastaa täysin eläimen ruoansulatuskanavasta imeytyvien aminohappojen koostumusta. Costan ym. (2016) mukaan mikrolevien valkuaisen *in vitro* -pötsihajoavuus vaihtelee suuresti levälajien välillä (*Spirulina platensis*

67 %, *Chlorella pyrenoidosa* 16 %, *Nannochloropsis oculata* 60 %, *Nannochloropsis* sp. 39 % kaseiinin pötsihajoavuudesta). Soijarouheen valkuaisen *in vitro* -pötsihajoavuus oli 52 % kaseiinin pötsihajoavuudesta (Costa ym. 2016). Härkäpavun valkuaisen pötsihajoavuus on noin 80 % (Luke 2016), joten se ja muut suurilta osin pötsissä hajoavat valkuaisrehut toimivat tehokkaammin typenlähteenä pötsimikrobeille kuin valkuaislisänä suoraan eläimelle (Puhakka ym. 2016). Aminohappojen saannin säätely eläimen tarvetta vastaavaksi on tehokkaampaa lisäämällä rehuun pötsissä hajoamatonta valkuaista kuin pyrkiä muuttamaan mikrobivalkuaisen aminohappokoostumusta (Korhonen ym. 2002b, Korhonen ym. 2002c), joten esimerkiksi *Spirulinan* hyvä aminohappokoostumus ei välttämättä lopulta vaikuta maidontuotantoon yhtä suotuisasti kuin rehun koostumuksesta voisi päätellä. Tässä tutkimuksessa mikrolevien pötsihajoavuutta yritettiin tutkia *in sacco* -menetelmällä, mutta rakenteeltaan tavanomaisista rehuista poikkeavat hienojakoiset mikroleväjauheet eivät soveltuneet tähän menetelmään. Mikrolevien pötsihajoavuudesta on hyvin vähän tutkimustietoa, mikä voi johtua osittain sopivien analyysimenetelmien kehittymättömyydestä.

Rehun ravintoaineiden sulavuus oli hyvin samanlaista kaikissa ruokinnoissa. Tämän tutkimuksen perusteella mikrolevät yltyvät lypsylehmien ruokinnassa sulavuuden suhteen samalle tasolle kuin soijarouhe. Skreden ym. (2011) mukaan raakavalkuaisen sulavuus huonontui, kun minkkien ruokinnassa mikrolevät korvasivat osan tavanomaisesta rehusta, mutta märehitijöiden pötsimikrobiston kyky sulattaa monimutkaisiakin soluseinäarakenteita ehkäisee vastaavanlaista sulavuuden vähenemistä lypsylehmien ruokinnassa. Tässä tutkimuksessa ravintoaineiden sulavuudet mikroleväruokinnoissa olivat melko samalla tasolla Ylisen (2015) ruokintakokeen ravintoaineiden sulavuuksien kanssa. Sen sijaan Ylisen (2015) käyttämän rypsirookinnan sulavuus oli parempi kuin tässä tutkimuksessa kontrolliruokinnassa käytetyn soijaruokinnan sulavuus, mikä tukee käsitystä rypsin hyvästä soveltuvuudesta lypsylehmien ruokintaan (Huhtanen ym. 2011). Lihakarjalle juomaveden seassa annettu *Spirulina* lisäsi syöntiä ja rehun sulavuutta Panjaitanin ym. (2014) kokeessa, jossa ruokinta perustui heinäpohjaiseen karkearehuun. Myös aikaisempi australialainen tutkimus (Panjaitan ym. 2010) osoitti *Spirulinan* tehostavan pötsin toimintaa ja lisäävän mikrobitypen tuotantoa, kun eläimet saivat rehulisän kautta ravinnostaan enemmän typpeä kuin pelkässä karkearehuruokinnassa. Ekstensiivisissä tuotantojärjestelmissä ja laidunnusmenetelmällä kasvatettaville märehitijöille mikrolevät voivat olla arvokas typenlähde, joka voi korvata esimerkiksi ureaa ja täydentää ruokin-



nan ravitsemuksellista arvoa. Toisaalta korkeatuottoisten lypsylehmien ruokinnassa ravintoaineiden tarve maidontuotantoon on suuri, joten mikrolevälisäys huonosti sulavan karkearehun sekaan ei välttämättä yksinään riitä ylläpitämään tehokasta maidontuotantoa. Kotrbáčekin ym. (2015) maininta *Chlorellan* rehun syöntiä ja sulavuutta parantavasta vaikutuksesta oli havaittavissa hyvin pieninä numeerisina eroina *Chlorella*-ruokintojen ja *Spirulinan* vertailussa. Mikrolevien ruokintamäärät olivat huomattavasti suuremmat tässä ruokintakokeessa kuin Kotrbáčekin ym. (2015) käsittelemissä tutkimuksissa.

### 6.3 Maitotuotos ja maidon koostumus

Koeruokinnat eivät aikaansaaneet tilastollisesti merkitseviä eroja maitotuotoksessa tai maidon koostumuksessa, mutta numeerisesti tarkasteltuna mikroleväruokinta paransi lehmien tuottavuutta. Ruokintakokeessa käytetty pieni eläinmäärä ja kahden havainnon puuttuminen yhden koelehmän jäädessä kesken kokeen pois vähentävät tilastollista voimaa ja tilastollisten erojen havaitsemista ruokintojen välillä. Maidontuotanto on vahvasti yhteydessä kuiva-aineen syöntiin (Huhtanen ym. 2007), ja syönnin ollessa hyvä kaikissa koeruokinnissa myös maidontuotanto pysyi johdonmukaisesti korkealla tasolla. Mikroleväruokinta ei vaikuttanut maitotuotokseen 7 viikkoa kestäneissä Franklinin ym. (1999) ja Christakin ym. (2012) ruokintakokeissa, mutta myös eroavia tuloksia on saatu. Kulpys ym. (2009) tutkivat *Spirulinan* vaikutusta lehtiin laktaation alkuvaiheessa, ja kolmen kuukauden aikana maitotuotos lisääntyi 6 kg 36 kg:aan päivässä, ollen kokeen lopussa 7 kg enemmän kuin kontrollidieetissä. Boeckertin ym. (2008) kahdesta ruokintakokeesta ensimmäisessä mikroleväruokinta laski tuotostason puoleen kontrolliruokinnan tasosta, ja jälkimmäisessä kokeessakin maitotuotos väheni ensimmäisen viikon jälkeen kontrolliruokintaa pienemmäksi.

Energiakorjattu maitotuotos oli soijaruokinnassa 29,3 kg/pv ja mikroleväruokinnissa numeerisesti hieman suurempi (*Spirulina* 33,9 kg/pv, *Chlorella* 30,0 kg/pv ja *Chlorellan* ja *Nannochloropsis* seos 30,5 kg/pv). *Spirulina*- sekä *Chlorella-Nannochloropsis*-ruokinnissa maidon määrä ja ravintoainepitoisuudet olivat numeerisesti hieman soija- ja *Chlorella*-ruokintoja suuremmat, mikä viittaa suuremman säilörehun syönnin ja samalla suuremman kuiva-aineen syönnin vaikuttavan positiivisesti maitotuotokseen.

Erityisesti *Spirulinan* käyttäminen rehussa antaa viitteitä maidontuotannon tehostumisesta ja rehun hyväksikäytön paranemisesta. Odens ym. (2007) ja Hostens ym. (2011) päättelivät lypsylehmien maitotuotoksen lisääntymisen johtuvan ainakin osittain rasvapitoisesta ruokinnasta, jossa rehuun lisättiin konjugoituneita linolihappoja eli CLA:ta (Odens ym. 2007) tai DHA-Gold -valmistetta *Schizochytrium*-mikrolevästä (Hostens ym. 2011). Näissä ruokintakokeissa maidon rasvapitoisuus vähentyi mutta kokonaistuotos lisääntyi, koska paljon energiaa vaativaan maitorasvan muodostamiseen kului määrällisesti tavallista vähemmän energiaa, ja näin ollen resursseja ohjautui muun tuotoksen lisäämiseen. Rasvapitoisten rehujen syöttäminen lehmille voi parantaa energiatasetta erityisesti poikimisen aikaan, mutta tyydyttymättömät rasvahapot voivat suurina määrinä aiheuttaa esimerkiksi syönnin vähenemistä ja ongelmia pötsin toiminnassa (Allen 2000, Odens ym. 2007). Wullepit ym. (2012) havaitsivat maitorasvan vähenemisen mutta muun tuotoksen säilymisen lähellä kontrolliruokinnan tasoa, kun koelehmät saivat DHA-Gold -levävalmistetta ennen poikimista ja sen jälkeen. Kulpys ym. (2009) oletivat *Spirulinan* aiheuttaman maitotuotoksen paranemisen johtuvan pötsin toiminnan tehostumisesta ja *Spirulinan* emäksisyydestä.

Rehun mikroleväpitoisuus ja muut rehuaineet voivat vaikuttaa merkittävästi tuotostasoon ja maidon koostumukseen. Ylisen (2015) mukaan suurin maito-, valkuais- ja rasvatuotos saavutettiin, kun *Spirulinan* ja *Chlorellan* seos korvasi puolet väkirehun rypsiä. Koko rypsiannoksen korvaaminen mikrolevillä vähensi numeerisesti tuotosta hieman kontrolliruokintaa vähäisemmäksi, mutta erot olivat hyvin pieniä (Ylinen 2015). *Spirulina* paransi Tarsian (2016) tutkimuksessa maito-, valkuais- ja laktoosituotosta levän korvatessa härkäpapua, mutta samalla maidon valkuais- ja laktoosipitoisuudet pienenevät maitomäärän lisääntyessä. Samassa ruokintakokeessa *Spirulinaa* ja rypsiä sisältävä ruokinta lisäsi maidon valkuais- ja rasvapitoisuutta maitotuotoksen samanaikaisesti vähentyessä rypsiiruokintaan verrattuna (Tarsia 2016).

Boeckert ym. (2008) päättelivät mikrolevien sisältämien monityydyttymättömien rasvahappojen olevan mahdollinen syy maitotuotoksen merkittävälle vähenemiselle ruokintakokeessa, jossa rehuun lisättiin *Schizochytrium*-mikrolevää. Pötsimikrobien toiminta voi muuttua rehun sisältäessä tavallista enemmän monityydyttymättömiä rasvahappoja, minkä seurauksena syönti, ravintoaineiden sulavuus sekä maitomäärä ja maidon pitoisuudet pienenevät (Boeckert ym. 2008). Tässä tutkimuksessa mikrolevät vaikuttivat suotuisasti maitotuotokseen, vaikka mikrolevädieetit sisälsivät enemmän rasva-

happoja kuin soijadieetti. Kaikkien mikrolevien rasvahappopitoisuus oli kuitenkin mallittainen, minkä vuoksi rasvahappojen kokonaissaanti jäi kohtuullisen pieneksi kaikissa koeruokinnissa (<500 g/pv, tulokset esitetty Stammin (2015) maisterintutkielmassa). Mikrolevälajien valinta, muut rehuaineet ja ruokintamenetelmät voivat vaikuttaa tulosten vaihtelevuuteen.

Mikroleväruokinta on lisännyt tuotosta erityisesti ruokintakokeissa, joissa mikrolevät ovat täydentäneet karkearehuruokintaa esimerkiksi valkuaisen tai energiansaannin osalta (Quigley ym. 2009, Panjaitan ym. 2010, Panjaitan ym. 2014). Jo valmiiksi ravintoarvoiltaan tasapainoisessa ruokinnassa tuotannonlisäys ei välttämättä ole leväruokinnan vaikutuksesta yhtä voimakas, kuten esimerkiksi korvattaessa valkuaisenlähteenä rypsiä mikrolevillä seosrehuruokinnassa (Tarsia 2016). Mikroleviä voidaan siis tarpeen mukaan hyödyntää ravintoainekoostumuksen täydentäjänä tai perinteisten rehujen korvaajana.

Rehun suuren valkuaispitoisuuden tarkoituksena on parantaa maitotuotosta mutta toisaalta välttää ylimääräisen typen erittymistä elimistöstä (Colmenero & Broderick 2006). Raakavalkuaisen ylikuokinta ilmenee pötsin ammoniakkipitoisuuden lisääntymisenä ja typen hyväksikäytön huonontumisena (Colmenero & Broderick 2006, Patton ym. 2014), ja lisäksi se on taloudellisesti kallista valkuaisrehujen ollessa ruokinnan arvokkaimpia komponentteja (Freer ym. 2007). Colmenero ja Broderick (2006) päättelivät lehmien maidontuotannon olevan parhaimmillaan, kun rehu sisältää 16-17 % raakavalkuaista. Tässä mikrolevätutkimuksessa syödyn rehun raakavalkuaispitoisuus oli kaikissa ruokinnissa tasainen, noin 15 %. Yleisesti ruokintojen raakavalkuaispitoisuus oli melko pieni, koska suuremman mikroleväpitoisuuden oletettiin vaikuttavan huomattavan negatiivisesti rehun maittavuuteen ja syöntiin.

Rehun hyväksikäyttö eli energiakorjatun maitotuotoksen (EKM) suhde kuiva-aineen syöntiin oli numeerisesti parempi mikroleväruokinnissa kuin soijaruokinnassa. Franklin ym. (1999) havaitsivat samanlaisen yhteyden rehun hyväksikäytössä, kun rehun syönti väheni mutta EKM ei muuttunut mikrolevädieeteissä. Tulosten perusteella *Spirulina*- ja *Chlorella*-levät voivat tehostaa rehun hyväksikäyttöä soijaan verrattuna. Valkuaisrehujen pötsihajoavuus vaikuttaa aminohappometaboliaan elimistössä, ja esimerkiksi *Spirulinan* suuri pötsihajoavuus tehostaa mikrobivalkuaisen tuotantoa, kun ruokinnan raakavalkuaispitoisuus on pieni (Costa ym. 2016). Pötsin mikrobitoiminnan lisääntymi-

nen voi parantaa myös rehunkäytön tehokkuutta. Korkea hyötysuhde on yksi kotieläinten ruokinnan tavoitelluimmista ominaisuuksista, joten mikroleväruokinnan avulla voisi mahdollisesti vähentää tarvittavan rehun määrää, kustannuksia ja ravintoaineiden hukkaantumista.

Maidon ureapitoisuus ei vaihdellut tilastollisesti merkitsevästi koeruokintojen välillä, mutta soijaruokintaan verrattuna *Spirulina*- ja *Chlorella-Nannochloropsis* -seoksen ruokinnassa ureaa oli maidossa numeerisesti vähemmän. *Chlorella*-ruokinnassa ureaa oli hieman enemmän kuin soijaruokinnassa. Typen erittyminen elimistöstä lisääntyy, jos pötsimikrobien käytettävissä on liikaa typpeä suhteessa energiansaantiin (Hof ym. 1997), mutta tässä tutkimuksessa maidon ureapitoisuuden perusteella rehun valkuais- ja energiapitoisuus näyttivät vastaavan toisiaan hyvin. Pattonin ym. (2014) mukaan maidon ureatyypipitoisuuden suositeltu tavallinen vaihteluväli on 10-15 mg/dL. Siihen verrattuna *Spirulina*-ruokinnassa maidon ureatyypipitoisuus oli pieni, 8,52 mg/dL, ja muissa ruokinnoissa pienehkö, 10,4-12,3 mg/dL. Myös Hofin ym. (1997) valkuaisrehututkimuksessa maidon ureapitoisuudet olivat suurempia (9,03-16,55 mg/dL) kuin tässä tutkimuksessa. Maidon ureapitoisuutta voi selittää osaltaan koeruokintojen suhteellisen pieni valkuaispitoisuus (150-154 g/kg ka). Nousiaisen ym. (2004) mukaan rehun raaka-alkuvalkuaispitoisuuden lisääntyminen korreloi maidon ureapitoisuuden lisääntymisen kanssa, ja samalla se ennakoiti typen hyväksikäytön huonontumista elimistössä ja suurempia tyypipäästöjä.

Tässä tutkimuksessa oli viitteitä rehun hyväksikäytön paranemisesta maidontuotantoon, tosin ei merkitsevästi, ja maidon ureapitoisuuden väheneminen erityisesti *Spirulina*-ruokinnassa näyttäisi tukevan havaintoa rehunkäytön tehostumisesta. Toisaalta erittäin pieni maidon ureapitoisuus voi olla merkki dieetin riittämättömästä valkuaispitoisuudesta (Kulpys ym. 2009). Härkäpavun kanssa syötettynä *Spirulina* paransi rehun hyväksikäyttöä rypsi-ruokinnan tasolle verrattuna pelkkään härkäpapuruokintaan (Tarsia 2016). Sen sijaan rypsi-seoksessa *Spirulina* ei vaikuttanut rehun hyväksikäytön tehokkuuteen eli energiakorjatun maitotuotoksen määrään syötyä kuiva-ainekiloa kohti (Tarsia 2016). Typen hyväksikäyttöä kuvaava urean määrä maidossa näyttää tasoittuvan *Spirulinan* vaikutuksesta ruokinnan koostumuksen vaihdeltaessa, sillä *Spirulina* vähensi ureapitoisuutta eli paransi typen hyödyntämistä tämän tutkimuksen soijaruokintaan ja Tarsian (2016) härkäpapuruokintaan verrattuna, mutta valkuaisrehuista parhaiten lypsylehmien ruokintaan soveltuvan rypsin kohdalla *Spirulina* lisäsi maidon ureapitoisuutta (Tarsia

2016). Ruokinnan epätasapainosta johtuva pitkäkestoinen maidon suuri ureapitoisuus voi heikentää lehmien terveyttä ja hedelmällisyyttä (Kulpys ym. 2009).

Tässä tutkimuksessa maitotuotos ja maidon komponenttien tuotokset olivat numeerisesti suuremmat mikroleväruokinnassa kuin soijaruokinnassa. Tämä johti maidon suurempaan rasvapitoisuuteen mikroleväruokinnassa mutta ei vaikuttanut valkuaisen ja laktoosin osuuksiin maidossa soijaan verrattuna. Plasman etikkahappo- ja BHBA-pitoisuuksien lisääntyminen erityisesti *Spirulina*-ruokinnassa viittaa maitorauhasen tehostuneeseen *de novo*-rasvahapposynteesiin, jossa muun muassa etikkahappo ja BHBA toimivat rasvahapposynteesin lähtöaineina (McDonald ym. 2011). Maidon rasvapitoisuuden lisääntyminen *Spirulina*-ruokinnassa voi johtua esimerkiksi pötsikäymisen tehostumisesta, jolloin pötsin aineenvaihduntatuotteita, kuten etikkahappoa, siirtyy plasmaan ja maitorauhaseen tavallista enemmän (Puhakka ym. 2016). Kulpysin ym. (2009) tutkimuksessa *Spirulinalla* ei ollut merkittävää vaikutusta maidon rasva-, valkuais- ja laktoosipitoisuuksiin kontrolliruokintaan verrattuna, vaikka maitotuotos suureni merkittävästi. Boeckert ym. (2008) raportoivat maitotuotoksen sekä maidon valkuais- ja laktoosipitoisuuden lisääntyneen mikroleväruokinnassa ensimmäisen koeviikon aikana, mutta maitotuotos ja rasva-, valkuais- ja laktoosipitoisuudet vähenivät toisen ja kolmannen viikon myötä kontrolliruokintaa pienemmiksi. Ylinen (2015) ei havainnut muutoksia maidon koostumuksessa mikrolevien korvatussa rypsiä, mutta numeerisesti mikroleväruokinta vähensi sekä rasvatuotosta että rasvapitoisuutta maidossa, toisin kuin tässä tutkimuksessa. Eroihin Ylisen (2015) ja tämän tutkimuksen tuloksissa vaikuttavat todennäköisesti erilaiset kontrolliruokinnat (rypsi vs. soija) ja koelehmien tuotosvaihe, joka oli Ylisen (2015) kokeessa keskimäärin 100 päivää myöhäisempi kuin tässä tutkimuksessa. Lisäksi lehmien tuotostaso oli Ylisen kokeessa selvästi matalampi.

Mikroleväruokinnan aiheuttamat rasvahappokoostumuksen muutokset maidossa olivat tässä kokeessa melko maltillisia (Stamm 2015), joten ei ollut oletettavissa, että leväruokinta vaikuttaisi maidon aistinvaraisiin ominaisuuksiin. Markkinointia ja kuluttajia ajatellen on tärkeää, ettei maitotuotteisiin ilmesty epämiellyttäväksi koettua, tietyistä tyydyttymättömistä rasvahapoista johtuvaa kalanhajua. Franklinin ym. (1999) ruokintakokeessa ammattimaiset maistajat eivät erottaneet mikroleväruokinnassa olleiden lehmien tuottamassa maidossa makuvirheitä. Mikroleväruokinnan vaikutusta eläintuotteiden ominaisuuksiin on selvitetty myös antamalla muun muassa kissakalaa (Li ym. 2009), naudanlihaa (Johnson ym. 2016) ja pekonia (Meadus ym. 2010) maistajaneelin arvioi-

tavaksi. Pieni määrä mikrolevävalmistetta rehussa ei näissä tutkimuksissa aiheuttanut poikkeavaa makua eläintuotteisiin verrattuna tavanomaisella rehulla tuotettuihin vastaviin elintarvikkeisiin, mutta esimerkiksi yli 1,5 % kalaöljyä kanojen rehussa (Surai ja Sparks 2001) ja yli 0,6 % DHA-mikrolevävalmistetta sikojen rehussa (Meadus ym. 2010) ovat tuottaneet elintarvikkeisiin epämiellyttäviä aromeja. Levärehujen prosessointi, levälajien valikointi ja antioksidanttien lisääminen rehuun voivat vähentää monityydyttymättömien rasvahappojen reaktioista johtuvia aistinvaraisia haittoja, mutta samalla rehun hinta nousee (Meadus ym. 2010, Bubel ym. 2011). Vähäisen leväruokinnan takia eläintuotteita ei tarvitse todennäköisesti erotella tavanomaisista tuotteista, ellei leväruokintaa haluta erityisesti korostaa tuotteiden markkinoinnissa (Johnson ym. 2016). Toisaalta kuluttajat saattavat suhtautua ennakkoluuloisesti uudella rehulla tuotettuihin elintarvikkeisiin, vaikka näiden tuotteiden ravintoainekoostumus olisi hieman parempi esimerkiksi vähemmän tyydyttyneitä rasvahappoja sisältävän koostumuksen suhteen.

#### **6.4 Plasman aineenvaihduntatuotteet**

Mikroleväruokinta vaikutti suuresti koelehmien veren aineenvaihduntatuotteisiin soijaruokintaan verrattuna. Plasman virtauksen väheneminen mikroleväruokinnassa viittaa suurempaan mikrobivalkuaisen määrään ruoansulatuksessa (Lapierre ym. 2012), eli mikroleväruokinnassa pötsimikrobien valkuaiissynteesi on mahdollisesti hieman tehostunut, mitä tukee myös rehun hyväksikäytön parantuminen mikroleväruokinnassa soijaruokintaan verrattuna. Maitorauhanen pystyy mukauttamaan aineenvaihduntaansa ravintoaineiden tarpeen ja saatavuuden mukaan, esimerkiksi hidastamalla tai tehostamalla plasman virtausta tai säätelemällä aminohappojen ottoa maitorauhaseen (Huhtanen ym. 2002, Korhonen ym. 2002c, Cant ym. 2003). Yksittäisten aminohappojen infusoinnin lypsylehmien elimistöön on todettu pienentävän plasman virtausta (Cant ym. 2003), eli vastaavasti tässä tutkimuksessa tulos voi viitata aminohappokoostumuksen parantumiseen mikroleväruokinnassa tarpeeseen nähden. Esimerkiksi Huhtanen ym. (2002) tutkimuksessa plasman virtaus oli kontrolliruokinnassa huomattavasti suurempaa (563 L/kg maitoa) kuin tässä tutkimuksessa soijaruokinnassa (430 L/kg maitoa). Huhtanen ym. (2002) ruokintakokeessa lypsylehmien rehun valkuaispitoisuus oli vain 137 g/kg ka, tosin lehmät olivat myös vähätuottoisempia kuin tämän kokeen koelehmät.

Etikkahapon lähes kaksinkertainen pitoisuus plasmassa *Spirulina*-ruokinnassa muihin mikroleviin ja soijaan verrattuna selittää maidon rasvapitoisuuden lisääntymistä etenkin *Spirulina*-ruokinnassa. Myös BHBA on *de novo* -rasvahapposynteesin lähtöaine, ja *Spirulina*-ruokinnassa sen valtimo-laskimo -erotus oli hieman suurempi kuin *Chlorella*-ruokinnoissa.

Glukoosin valtimo-laskimo -erotus oli valtimopitoisuudesta poiketen pienin soijaruokinnassa verrattuna mikroleviin. Erotuksen mukaan glukoosin otto maitorauhaseen on ollut tehokkaampaa mikroleväruokinnoissa. Erot valtimon glukoositasoissa olivat kuitenkin hyvin pieniä. Plasman glukoosipitoisuus kuvastaa eläimen energiansaantia, ja erittäin pieni plasman glukoosipitoisuuden väheneminen mikroleväruokinnoissa antaa hieman viitteitä energiataseen huonontumisesta mikroleväruokinnoissa. Glukoosipitoisuus on yhteydessä plasman NEFA-pitoisuuteen, joka heijastaa kudosten mobilisaatiota (Huhtanen ym. 2002). Soijaruokinnassa NEFA-pitoisuus valtimossa ja valtimo-laskimo -erotus olivat hieman pienempiä verrattuna mikroleväruokintoihin. Myös plasman insuliinipitoisuuden väheneminen mikroleväruokinnoissa soijaruokintaan nähden, erityisesti *Chlorellaa* ja *Nannochloropsisista* sisältävissä ruokinnoissa, viittaa vähäisempään energiansaantiin.

Etikkahapon oton lisääntyminen plasmasta mikroleväruokinnoissa ja erityisesti *Spirulina*-ruokinnassa viittaa jo aikaisemmin mainittuun maitorasvan tehostuneeseen tuottamiseen maitorauhasessa *de novo* -synteesin kautta. Plasman etikkahappopitoisuuden lisääntyminen saattaa johtua pötsin etikkahappovaltaisemmasta käymisestä (Puhakka ym. 2016), mitä tukee myös *Spirulina*-ruokinnan numeerisesti suurin säilörehun syönti ja NDF:n saanti. Kudoksista mobilisoidun NEFA:n otto maitorauhaseen oli sen sijaan negatiivista tai hyvin vähäistä, eli vapaita rasvahappoja ei käytetty merkittävästi maitorasvan tuottamiseen elimistön energiavarastoista tässä kokeessa.

Zhun ym. (2016) kokeessa vuohien pötsiin infusoitu *Schizochytrium*-mikrolevä (18,3 g/pv) lisäsi pötsinesteen propioni- ja voihappopitoisuutta mutta vähensi sen sijaan etikkahappopitoisuutta, toisin kuin tässä tutkimuksessa plasmapitoisuuksien perusteella kävi. Mikrolevien sisältämät monityydyttymättömät rasvahapot voivat aiheuttaa muutoksia pötsin bakteerien määrässä ja lajistossa, sillä toiset bakteerilajit sietävät vapaita, tyydyttymättömiä rasvahappoja paremmin ja toisille ne ovat myrkyllisiä (Zhu ym. 2016). Erot tyydyttymättömien rasvahappojen saannissa olivat kuitenkin tässä kokeessa

suhteellisen pieniä ja kokonaisrasvahappojen saanti hyvin maltillista (Stamm 2015). Kokeessa ei otettu pötsinestenytytteitä, joten mikrolevien vaikutusta pötsikäymiseen voidaan käsitellä vain teoreettisesti. Koeruokintojen koostumus, koe-eläimet ja olosuhteet vaikuttavat paljon pötsin toimintaan, joten vertailuja eri tutkimusten välillä on vaikea tehdä (Zhu ym. 2016).

Plasman metaboliitit kuvastavat eläimen energiatasapainoa. Negatiivisessa energiata- seessa eläin mobilisoi energiaa ja ravintoaineita omista kudoksistaan ja laihtuu, koska ravinnonsaanti ei ole riittävää ylläpitoon ja tuotokseen suhteutettuna (McDonald ym. 2011, Gaillard ym. 2016). Tässä ruokintakokeessa plasman aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksissa oli eroja, jotka viittaavat lehmien energiataseen huonontuneen mikrolevä- ruokinnassa soijaruokintaan verrattuna. Glukoosi- ja insuliinipitoisuuden väheneminen veressä sekä BHBA:n ja NEFA:n osuuden lisääntyminen ovat merkkejä kudosten mobi- lisaatiosta (Ingvarsen ym. 2006, Odens ym. 2007, Hostens ym. 2011, Gaillard ym. 2016). Plasman NEFA-pitoisuuden lisääntyminen on tyypillistä poikimisen jälkeen, kun kehon rasvavarastoja käytetään maidontuotantoon (Ingvarsen ym. 2006). Koelehmien keskimääräisen elopainon pienentyminen tutkimuksen aikana 652 kg:sta 636 kg:aan tukee myös havaintoa riittämättömästä energiansaannista mikroleväruokinnossa. Plas- man NEFA-pitoisuus on usein yhteydessä kuiva-aineen syöntiin (Ingvarsen ym. 2006), koska vähäinen syönti lisää kudostobilisaation tarvetta. Tässä tutkimuksessa plasman NEFA-pitoisuuden lisääntyminen erityisesti *Spirulina*-ruokinnassa saattoi olla seurausta väkirehun korvaamisesta säilörehun syönnillä. Muutokset plasman koostumuksessa olivat samansuuntaisia kuin Hostensin ym. (2011) tutkimuksessa, jossa lehmille annetiin DHA-pitoista mikrolevävalmistetta. Sen sijaan Odensin ym. (2007) ruokintakokees- sa veren glukoositaso nousi ja NEFA-pitoisuus väheni, eli lehmien energiatase parani poikimisen aikaan CLA-ruokinnassa maidon vähentyneen rasvapitoisuuden ansiosta. *Spirulina*-ruokinta ei vaikuttanut Ylisen (2015) tutkimuksessa huomattavasti veren me- taboliittipitoisuuksiin, mikä viittaa koelehmien saaneen kyseisen kokeen aikana tarpeek- si energiaa rehusta. Samoin Wullepit ym. (2012) eivät havainneet mikroleväruokinnan vaikuttavan merkitsevästi veren aineenvaihduntatuotteisiin tai lehmien kuntoluokkaan. Tässä ruokintakokeessa mikrolevien maittavuusongelmat saattoivat olla syynä energia- taseen huonontumiseen, vaikka koelehmät kompensoivat vähentynyttä leväväkirehun syöntiä tehokkaasti säilörehun avulla, koska säilörehu oli väkirehuja vähäenergempää. Mikrolevien syöttäminen ja eläinten seuraaminen pidemmällä aikavälillä voisi antaa



vielä selkeämpiä tuloksia levien vaikutuksesta lehmien energiataseeseen ja tuotokseen, sillä tässä tutkimuksessa laihtumista indikoivat veren metaboliittiarvot eivät vielä vaikuttaneet maidontuotantoa vähentävästi.

## 6.5 Plasman aminohapot

Plasman aminohappopitoisuudet kuvastavat aminohappojen tasapainoa niiden saannin ja elimistön metabolian välillä (Meijer ym. 1995). Tietyt välttämättömät aminohapot, erityisesti haaraketjuiset aminohapot, toimivat metabolisina signaaleina kuvastaen eläimen ravitsemustilaa, mikä näkyy näiden aminohappojen pitoisuuksissa eri kudoksissa (Mackle ym. 1999, Lapierre ym. 2012).

Sekä valtimon että valtimo-laskimo -erotuksen kokonaisaminohappopitoisuudet olivat numeerisesti suurimpia *Spirulina*-ruokinnassa, vaikka soijaruokinta sisälsi eniten aminohappoja. Valtimon metioniinipitoisuus oli toiseksi suurin soijaruokinnassa, vaikka metioniinia oli rehujen koostumuksen ja aminohappojen saannin mukaan soijaruokinnassa kaikista vähiten. Vertailussa Pattonin ym. (2015) meta-analyysin aminohappojen keskimääräisiin plasmapitoisuuksiin histidiiniä ja lysiniä oli tässä tutkimuksessa plasmassa runsaasti, mutta metioniinia suunnilleen saman verran. Histidiiniä voidaan muodostaa endogeenisesti karnosiinista eli  $\beta$ -alanyyli-L-histidiinistä, mikä voi väliaikaisesti lisätä osaltaan histidiinin saatavuutta, vaikka rehun histidiinipitoisuus ei olisikaan huomattavan suuri. Tässä tutkimuksessa plasman histidiinipitoisuus oli keskimäärin hieman suurempi kaikissa ruokinnoissa (soija 63,4, *Spirulina* 52,3, *Chlorella* 56,9 ja *Chlorella-Nannochloropsis* 45,5  $\mu\text{mol/L}$ ) verrattuna esimerkiksi Vanhatalon ym. (1999) vastaaviin arvoihin kontrolliruokinnassa (18  $\mu\text{mol/L}$ ) ja histidiiniä sisältäneiden infuusioiden jälkeen (38-57  $\mu\text{mol/L}$ ). Plasman metioniinipitoisuus oli kaikissa ruokinnoissa (20,9-25,9  $\mu\text{mol/L}$ ) lähellä Appuhamyn ym. (2011) kontrollitasoa (23,3  $\mu\text{mol/L}$ ), mutta kyseisessä tutkimuksessa plasman metioniinipitoisuutta saatiin lisättyä metioniini-infusiolla huomattavasti (31,1  $\mu\text{mol/L}$ ). Myös Pisulewskin ym. (1996) tutkimuksessa metioniini-infusiot lisäsivät tehokkaasti plasman metioniinipitoisuutta (21,3-37,3  $\mu\text{mol/L}$ ) kontrolliin (15,2  $\mu\text{mol/L}$ ) verrattuna. Näiden tutkimusten perusteella tuotosvaste olisi todennäköisesti voinut olla tässäkin ruokintakokeessa vielä suurempi, jos koelehmät olisivat saaneet enemmän metioniinia. Metioniini-infusiot lisäsivät Appuhamyn ym. (2011) ja

Pisulewskin ym. (1996) tutkimuksissa merkitsevästi nimenomaan maidon valkuais-  
tuotosta.

Haaraketjuisilla aminohapoilla (BCAA), joihin kuuluvat välttämättömät aminohapot leusiini, isoleusiini ja valiini, voi olla tärkeä merkitys lypsylehmien ruokinnassa (Appuhamy ym. 2011). NRC:n (2001) mukaan haaraketjuiset aminohapot saattavat ainakin laskennallisesti olla tuotantoa rajoittavia aminohappoja metioniinin ja lysiinin jälkeen. Lähes 50 % maidon valkuaisen välttämättömistä aminohapoista on BCAA:ta (Mackle ym. 1999). Appuhamyn ym. (2011) tutkimuksessa plasman metioniini- ja lysiinipitoisuus lisääntyivät merkitsevästi, kun niitä infusoitiin suoraan verenkiertoon, mutta niiden lisäksi annetut BCAA-infuusiot eivät enää merkitsevästi parantaneet välttämättömien aminohappojen pitoisuutta plasmassa tai tuotantovastetta. Mackle ym. (1999) ja Korhonen ym. (2002a) päätyivät samanlaiseen tulokseen, kun BCAA:ta infusoitiin plasmassa. Suuremman BCAA-saannin oletetaan kuitenkin auttavan ylläpitämään lihasvalkuaisaineiden tasapainoa maidontuotannon aikana ja tehostavan rehun hyväksikäyttöä maidon ureapitoisuuden vähentyessä (Appuhamy ym. 2011).

Aminohappojen otto-eritys -suhde laskettiin maitorauhasen plasmasta ottamien ja maitoon eritettyjen aminohappojen perusteella (Lapierre ym. 2012). Näin ollen aminohapot, joiden otto-eritys -suhde on alle 1, voivat olla maidontuotantoa rajoittavia, koska otto maitorauhasesta on erityistä pienempää. Kun otto-eritys -suhde on yli 1, aminohappoja otetaan maitorauhasesta ylimäärin tarpeeseen nähden, ja niitä muokkaamalla voidaan muodostaa muita tarvittavia yhdisteitä. Esimerkiksi ylimääräisiä maitorauhasesta otettuja haaraketjuisia aminohappoja voidaan käyttää ei-välttämättömien aminohappojen muodostamiseen ja energiantuotantoon, jolloin kudostamistarve aineenvaihdunnan prosesseihin ja maidontuotantoon vähenee (Mackle ym. 1999, Huhtanen ym. 2002, Lapierre ym. 2012). Aminohappojen otto-eritys -suhde maitorauhasessa oli kaikissa ruokinnoissa histidiinin ja lysiinin kohdalla yli 1, ja vastaavasti metioniinilla alle 1, mikä viittaa metioniinin rajoittaneen maidontuotantoa tässä kokeessa. Lapierre ym. (2012) esittivät meta-analysissään samansuuntaisia maitorauhasen aminohappojen otto-eritys -arvoja kuin tässä tutkimuksessa, eli histidiiniä ja lysiiniä otettiin maitorauhasesta hieman enemmän ( $>1$ ) ja metioniinia hieman vähemmän ( $<1$ ) kuin maitoon eritettiin. Myös ruokinnan energiapitoisuus voi rajoittaa maidontuotantoa, vaikka aminohappoja olisi saatavilla tarpeeksi (Huhtanen ym. 2002). Mikrolevärehujen hyvän aminohappokoostumuksen lisäksi on siis huolehdittava ruokinnan riittävästä energiapi-

toisuudesta, mikä voi olla haasteellista, jos eläimet korvaavat tämän tutkimuksen tapaan huonosti maittavaa levävikirehua vähäenergisemmällä säilörehulla.

Aminohappojen ottotehokkuuden suureneminen mikroleväruokinnossa soijaruokintaan verrattuna viittaa maidontuotannon tehostumiseen rehun sisältäessä mikrolevää. Infusoidessa yksittäisiä aminohappoja (histidiini, metioniini ja/tai lysiini) niiden pitoisuudet plasmassa tyypillisesti lisääntyvät ja täten saatavuus paranee, mutta maitorauhasen ottotehokkuus pienenee (Guinard ja Rulquin 1995, Vanhatalo ym. 1999, Korhonen ym. 2000). Korhosen ym. (2002c) tutkimuksessa nurmisäilörehuun, ohraan ja soijaruokintaan perustuvassa ruokinnassa maitorauhasen aminohappojen ottotehokkuus oli samaa tasoa histidiinin kohdalla (36 %) kuin tässä tutkimuksessa (25-40 %). Sen sijaan lysiinin (48 % vs. soija 56 % ja mikrolevät 58-64 %) ja metioniinin (58 % vs. soija 55 % ja mikrolevät 64-70 %) ottotehokkuudet olivat tässä tutkimuksessa suuremmat etenkin mikroleväruokinnossa. Vertailu Korhosen ym. (2002c) tutkimukseen viittaa lysiinin saannin vähäisyyteen tässä ruokintakokeessa metioniinin ohella.

## 7 Johtopäätökset

Tämän ruokintakokeen tulosten perusteella mikrolevät olivat ravintoainekoostumukseltaan soijarouhetta parempia ja saivat aikaan numeerisesti hieman korkeampia maitotuotosvasteita. Kuitenkin maitotuotoksessa ja maidon koostumuksessa ainoa tilastollinen ero ruokintojen välillä oli rasvapitoisuuden vähäinen lisääntyminen mikroleväruokinnossa, etenkin *Spirulina*-ruokinnassa. Tutkimuksen valkuaisrehut erosivat aminohappokoostumukseltaan siten, että soijavalikuaisessa histidiini- ja lysiinipitoisuudet olivat mikrolevävalkuaisista suurempia, mutta mikrolevävalkuaisen metioniinipitoisuus oli lähes kaksinkertainen soijaan verrattuna. Näiden aminohappojen pitoisuudet rehussa heijastuivat samankaltaisesti niiden saantiin ja plasmapitoisuuteen, mutta tuotosvasteiden ja maitorauhasen metabolian perusteella metioniini oli todennäköisesti rajoittavin aminohappo kaikissa ruokinnossa.

Mikroleväruokinta antoi viitteitä rehunkäytön ja pötsimikrobien toiminnan tehostumisesta, mutta mikrolevien tyydyttymättömät rasvahapot ja aistinvaraiset ominaisuudet voivat aiheuttaa maittavuusongelmia ja vähentää syöntiä. Tässä tutkimuksessa mikrolevää sisältävät rehut vähensivät koelehmien väkirehun syöntiä, mutta eläimet kompensoivat ravinnonsaantia lisäämällä vastaavasti säilörehun syöntiä. Tämä voi kuitenkin johtaa energiansaannin vähenemiseen ja kudostobilisaatioon. Tämän ruokintakokeen eläinmäärä oli pieni, ja lisäksi tuloksista puuttui yksi havainto sekä *Spirulina*- että *Chlorella*-ruokinnosta, joten ruokintojen väliset erot eivät tulleet kovin voimakkaasti esille. Suurten SEM-arvojen takia tilastollisesti merkitseviä eroja ilmeni vain vähän.

Mikrolevärehujen vaikutus syöntiin sekä korkeat tuotantokustannukset hidastavat niiden laajamittaista käyttöönottoa kotieläinten ruokinnassa, vaikka ravitsemuksellisen koostumuksen puolesta mikrolevissä on paljon potentiaalia korvaamaan perinteisiä valkuaisrehuja. Tarvitaan vielä paljon lisää luotettavaa tietoa ja menetelmien kehittelyä, jotta siirtyminen perinteisten valkuaisrehujen käytöstä mikroleväruokintaan olisi kannattavaa.

## **Kiitokset**

Haluan kiittää tutkijatohtori Anni Halmemies-Beauchet-Filleau'ta maisterintutkielmani ohjaamisesta, arvokkaasta palautteesta ja pitkäjänteisestä työstä aiheen parissa. Lisäksi suuri kiitos kuuluu leväprojektissa mukana olleelle tohtorikoulutettava Marjukka Lamiselle ja kaikille ruokintakokeeseen ja tutkielman työstämiseen osallistuneille henkilöille Viikissä.

## Lähteet

- Abdulrahman, N. M. & Ameen, H. J. H. 2014. Replacement of fishmeal with microalgae *Spirulina* on common carp weight gain, meat and sensitive composition and survival. *Pakistan Journal of Nutrition* 13: 93-98
- Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P. & Varvikko, T. 2000. Determination of reticulo-rumen and whole-stomach digestion in lactating cows by omasal canal or duodenal sampling. *British Journal of Nutrition* 83: 67–77
- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83: 1598-1624
- Andersen, R. A. 2013. The microalgal cell. Teoksessa: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2). Toim. Richmond, A. & Hu, Q. Chichester, West Sussex, U.K.: Wiley-Blackwell. s. 3-20
- AOAC. 1995. Official methods of analysis, 16th edition. Association of official analytic chemists, Arlington, VA, USA.
- Appuhamy, J. A. D. R. N., Knapp, J. R., Becvar, O., Escobar, J. & Hanigan, M. D. 2011. Effects of jugular-infused lysine, methionine, and branched-chain amino acids on milk protein synthesis in high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94 :1952-1960
- Barker, S. B. & Summerson, W. H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological materials. *The Journal of Biological Chemistry* 138: 537-554
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press. 320 s.
- Becker, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25: 207-210
- Becker, E. W. 2013. Microalgae for human and animal nutrition. Teoksessa: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2). Toim. Richmond, A. & Hu, Q. Chichester, West Sussex, U.K.: Wiley-Blackwell. s. 461-503
- Belay, A. 2013. Biology and industrial production of *Arthrospira* (*Spirulina*). Teoksessa: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2). Toim. Richmond, A. & Hu, Q. Chichester, West Sussex, U.K.: Wiley-Blackwell. s. 339-358
- Belay, A., Kato, T. & Ota, Y. 1996. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology* 8: 303-311

- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespén, T., Van Stralen, 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
- Borowitzka, M. A. 2013. Species and strain selection. *Teoksessa: Algae for Biofuels and Energy*. Toim. Borowitzka, M. A. & Moheimani, N. R. Dordrecht, New York: Springer. s. 77-89
- Bruneel, C., Lemahieu, C., Ryckebosch, E., Fraeye, I., Muylaert, K., Buyse, J. & Foubert, I. 2013. Impact of microalgal feed supplementation on omega-3 fatty acid enrichment of hen eggs. *Journal of Functional Foods* 5: 897-904
- Bubel, F., Dobrzański, Z., Bykowski, P., Patkowska-Sokoła, B. & Trziszka, T. 2011. Enrichment of hen eggs with omega-3 polyunsaturated fatty acids – physiological and nutritional aspects. *Acta Scientiarum Polonorum, Medicina Veterinaria* 10: 5-18
- 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
- Cant, J. P., Berthiaume, R., Lapierre, H., Luimes, P. H., McBride, B. W. & Pacheco, D. 2003. Responses of the bovine mammary glands to absorptive supply of single amino acids. *Canadian Journal of Animal Science* 83: 341-355
- Chen, X. B. & Gomez, M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details. <http://www.macaulay.ac.uk/IFRU/pdf/chema.pdf>. Occasional Publication 1992. International Feed Resources Unit, Aberdeen, Iso-Britannia.
- Chowdhury, S. A., Huque, K. S., Khatun, M. & Nahar, Q. 1995. Study on the use of algae as a substitute for oil cake for growing calves. *Livestock Research for Rural Development* 6, artikkeli 26.
- Christaki, E., Karatzia, M., Bonos, M., Florou-Paneri, C. & Karatzias, C. 2012. Effect of dietary *Spirulina platensis* on milk fatty acid profile of dairy cows. *Asian Journal of Animal and Veterinary Sciences* 7: 597-604
- Colmenero, J. J. O. & Broderick, G. A. 2006. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89: 1704-1712
- Costa, D. F. A., Quigley, S. P., Isherwood, P., McLennan, S. R. & Poppi, D. P. 2016. Supplementation of cattle fed tropical grasses with microalgae increases microbial protein production and average daily gain. *Journal of Animal Science* 94: 2047-2058

- Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M. & Posewitz, M. C. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 235-240
- Drewery, M. L., Sawyer, J. E. & Wickersham, T. A. 2012. Palatability of post-extraction algal residue as a protein supplement for cattle. *Journal of Dairy Science* 95: 342. <http://www.jtmtg.org/JAM/2012/abstracts.asp> Viitattu 12.9.2016.
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T. & Webster, G. 1989. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72: 68-78
- 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. *Official Journal of the European Communities L 257*. s. 4-23
- Franklin, S. T., Martin, K. R., Baer, R. J., Schingoethe, D. J. & Hippen, A. R. 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *The Journal of Nutrition* 129: 2048-2054
- Freer, M., Dove, H. & Nolan, J. V. (toim.). 2007. *Nutrient Requirements of Domesticated Ruminants*. Collingwood, VIC: CSIRO Publishing. 270 s.
- Freire, I., Cortina-Burgueño, A., Grille, P., Arizcun-Arizcun, M., Abellán, E., Segura, M., Witt Sousa, F. & Otero, A. 2016. *Nannochloropsis limnetica*: A freshwater microalga for marine aquaculture. *Aquaculture* 459: 124-130
- 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 cellulase method]. *Wissenschaftliche Zeitung Universität Rostock, N-Reihe* 39: 78-86
- Gaillard, C., Vestergaard M., Weisbjerg, M. R. & Sehested, J. 2016. Effects of live weight adjusted feeding strategy on plasma indicators of energy balance in Holstein cows managed for extended lactation. *Animal* 10: 633-642
- 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
- Gill, M. 2012. *Converting feed into human food: the multiple dimensions of efficiency*. Julkaisussa: *Optimization of feed use efficiency in ruminant production systems*. Toim. Makkar, H. P. S. & Beever, D. *Proceedings of the FAO Symposium, 27 November 2012, Bangkok, Thailand*. FAO Animal Production and Health Pro-



- ceedings, No. 16. Rome, FAO and Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. s. 1-13
- Godfray, H. C. J., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Nisbett, N., Pretty, J., Robinson, S., Toulmin, C. & Whiteley, R. 2010. The future of the global food system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 2769-2779
- Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A. & Bandarra, N. M. 2008. Microalgae in novel food products. *Teoksessa: Food Chemistry Research Developments*. Toim. Papadopoulos, K. N. New York, U.S.A.: Nova Science Publishers, Inc. s. 75-111
- Guinard, J. & Rulquin, H. 1995. Effects of graded amounts of duodenal infusions of methionine on the mammary uptake of major milk precursors in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 78: 2196-2207
- Habib, M. A. B., Parvin, M., Huntington, T. C. & Hasan, M. R. 2008. A Review On Culture, Production and Use of *Spirulina* as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*. No. 1034. Rome, FAO. 2008. 33 s.
- 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
- Hof, G., Vervoorn, M. 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. 2013. *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 615-623
- Hostens, M., Fievez, V., Vlaeminck, B., Buyse, J., Leroy, J., Piepers, S., De Vliegher, S. & Opsomer, G. 2011. The effect of marine algae in the ration of high-yielding dairy cows during transition on metabolic parameters in serum and follicular fluid around parturition. *Journal of Dairy Science* 94: 4603-4615
- Hu, Q. 2013. Environmental effects on cell composition. *Teoksessa: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2). Toim. Richmond, A. & Hu, Q. Chichester, West Sussex, U.K.: Wiley-Blackwell. s. 114-122
- Huhtanen, P., Hetta, M. & Swensson, C. 2011. Evaluation of canola meal as a protein supplement for dairy cows: A review and a 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: 758–770
- Huhtanen, P., Vanhatalo, A. & Varvikko, T. 2002. Effects of abomasal infusions of histidine, glucose, and leucine on milk production and plasma metabolites of dairy cows fed grass silage diets. *Journal of Dairy Science* 85: 204-216
- 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
- Ingvartsen, K. L. 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow: physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology* 126: 175-213
- Johnson, M. D., Miller, R. K., Morrill, J. C., Anderson, D. P., Wickersham, T. A., Sawyer, J. E., Richardson, J. W. & Palma, M. A. 2016. The influence of taste in willingness-to-pay valuations of sirloin steaks from postextraction algal residue-fed cattle. *Journal of Animal Science* 94: 3072-3083
- Kaukovirta-Norja, A., Leinonen, A., Morkkila, M., Wessberg, N. & Niemi, J. 2015. Tiekartta Suomen proteiiniomavaraisuuden parantamiseksi. Verkköjulkaisu. VTT Visions 6. [www.vtt.fi/inf/pdf/visions/2015/V6.pdf](http://www.vtt.fi/inf/pdf/visions/2015/V6.pdf) Viitattu 9.12.2016.
- Kim, C. H., Kim, T. G., Choung, J. J. & Chamberlain, D. G. 1999. Determination of the first limiting amino acid for milk production in dairy cows consuming a diet of grass silage and a cereal-based supplement containing feather meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1703-1708
- Koivunen, E. 2016. Home-grown grain legumes in poultry diets. *Dissertationes Scholae doctoralis scientiae circumiectalis, alimentariae, biologicae Universitatis Helsinkiensis*. No. 5/2016. Helsinki: University of Helsinki. 59 s.
- Korhonen, M., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., & Huhtanen, P. 2002b. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: II. Amino acid profile of microbial fractions. *Journal of Animal Science* 80: 2188-2196
- Korhonen, M., Vanhatalo, A. & Huhtanen, P. 2002a. Evaluation of isoleucine, leucine, and valine as a second-limiting amino acid for milk production in dairy cows fed grass silage diet. *Journal of Dairy Science* 85: 1533-1545

- Korhonen, M., Vanhatalo, A. & Huhtanen, P. 2002c. 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: 3336-3351
- Korhonen, M., Vanhatalo, A., Varvikko, T. & Huhtanen, P. 2000. Responses to graded postruminal doses of histidine in dairy cows fed grass silage diets. *Journal of Dairy Science* 83: 2596-2608
- Kotrbaček, V., Doubek, J. & Doucha, J. 2015. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *Journal of Applied Phycology* 27: 2173-2180
- Kovač, D. J., Simeunović, J. B., Babić, O. B., Mišan, A. Č. & Milovanović, I. L. 2013. Algae in food and feed. *Food & Feed Research* 40: 21-32
- Kuhad, R. C., Singh, A., Tripathi, K. K., Saxena, R. K. & Eriksson, K.-E. L. 1997. Microorganisms as an alternative source of protein. *Nutrition Reviews* 55: 65-75
- 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: 823-835
- Kuoppala, K., Rinne, M., Ahvenjärvi, S., Nousiainen, J. & Huhtanen, P. 2010. The effect of harvesting strategy of grass silage on digestion and nutrient supply in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93: 3253-3263
- Lapierre, H., Lobley, G. E., Doepel, L., Raggio, G., Rulquin, H. & Lemosquet, S. 2012. Triennial Lactation Symposium: Mammary metabolism of amino acids in dairy cows. *Journal of Animal Science* 90: 1708-1721
- Lee, Y.-K., Chen, W., Shen, H., Han, D., Li, Y., Jones, H. D. T., Timlin, J. A. & Hu, Q. 2013. Basic culturing and analytical measurement techniques. *Teoksessa: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology (2)*. Toim. Richmond, A. & Hu, Q. Chichester, West Sussex, U.K.: Wiley-Blackwell. s. 37-68
- Li, M. H., Robinson, E. H., Tucker, C. S., Manning, B. B. & Khoo, L. 2009. Effects of dried algae *Schizochytrium* sp., a rich source of docosahexaenoic acid, on growth, fatty acid composition, and sensory quality of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 292: 232-236
- Liu, J. & Hu, Q. 2013. *Chlorella*: industrial production of cell mass and chemicals. *Teoksessa: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology (2)*. Toim. Richmond, A. & Hu, Q. Chichester, West Sussex, U.K.: Wiley-Blackwell. s. 329-338

- 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: 1-7
- Lunkka-Hytönen, M., Lohtander-Buckbee, K. & Ruohonen-Lehto, M. 2016. Levät ja biotalous biotekniikan näkökulmasta. Verkkojulkaisu. Suomen ympäristökeskuksen raportteja 4/2016. [www.syke.fi/julkaisut](http://www.syke.fi/julkaisut) Viitattu 15.9.2016.
- Luonnonvarakeskus. 2016. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset. Verkkojulkaisu. Jokioinen: LUKE Luonnonvarakeskus. <https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Rehutaulukot/Rehutaulukot/marehtijat> Viitattu 16.3.2017.
- Ma, X.-N., Chen, T.-P., Yang, B., Liu, J. & Chen, F. 2016. Lipid production from *Nannochloropsis*. *Marine Drugs* 14, E61. DOI: 10.3390/md14040061
- Mackle, T. R., Dwyer, D. A. & Bauman, D. E. 1999. Effects of branched-chain amino acids and sodium caseinate on milk protein concentration and yield from dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82: 161-171
- Makkar, H. P. S. 2012. Towards sustainable animal diets. Julkaisussa: Optimization of feed use efficiency in ruminant production systems. Toim. Makkar, H. P. S. & Beever, D. Proceedings of the FAO Symposium, 27 November 2012, Bangkok, Thailand. FAO Animal Production and Health Proceedings, No. 16. Rome, FAO and Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. s. 67-74
- Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetanob, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-232
- Matos, Â. P., Feller, R., Moecke, E. H. S., de Oliveira, J. V., Furigo Jr., A., Derner, R. B. & Sant'Anna, E. S. 2016. Chemical characterization of six microalgae with potential utility for food application. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 93: 963-972
- 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. A., Sinclair, L. A. & Wilkinson, R. G. 2011. *Animal Nutrition*. Pearson. 7. painos. 692 s.
- Meadus, W. J., Duff, P., Uttaro, B., Aalhus, J. L., Rolland, D. C., Gibson, L. L. & Dugan, M. E. R. 2010. Production of docosahexaenoic acid (DHA) enriched bacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 465-472
- Meijer, G. A. L., Van Der Meulen, J., Bakker, J. G. M., Van Der Koelen, C. J. & Van Vuuren, A. M. 1995. Free amino acids in plasma and muscle of high yielding dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 78: 1131-1141

- Miller, E. L. 2004. Protein nutrition requirements of farmed livestock and dietary supply. Julkaisussa: Protein Sources for the Animal Feed Industry: Expert Consultation and Workshop. FAO Animal Production and Health Proceedings. Rome: FAO. s. 29-76
- Moate, P. J., Williams, S. R. O., Hannah, M. C., Eckard, R. J., Auldist, M. J., Ribaux, B. E., Jacobs, J.L. & Wales, W. J. 2013. Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96: 3177-3188
- National Research Council (U.S.). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition. Washington, D.C.: National Academy Press. 381 s.
- Niemi, J. & Huan-Niemi, E. 2012. Global trade in agricultural inputs. The 22nd Annual IFAMA World Forum and Symposium, 'The Road to 2050: The China Factor', 11-14 June 2012. Shanghai, Kiina. 11 s.
- 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
- Nousiainen, J., Shingfield, K. J. & Huhtanen, P. 2004. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. *Journal of Dairy Science* 87: 386-398
- Odens, L. J., Burgos, R., Innocenti, M., VanBaale, M. J. & Baumgard, L. H. 2007. Effects of varying doses of supplemental conjugated linoleic acid on production and energetic variables during the transition period. *Journal of Dairy Science* 90: 293-305
- Panjaitan, T., Quigley, S. P., McLennan, S. R. & Poppi, D. P. 2010. Effect of the concentration of *Spirulina (Spirulina platensis)* algae in the drinking water on water intake by cattle and the proportion of algae bypassing the rumen. *Animal Production Science* 50: 405-409
- Panjaitan, T., Quigley, S. P., McLennan, S. R., Swain, A. J. & Poppi, D. P. 2014. *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
- Patton, R. A., Hristov, A. N. & Lapierre, H. 2014. Protein feeding and balancing for amino acids in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 30: 599-621
- Patton, R. A., Hristov, A. N., Parys, C. & Lapierre, H. 2015. Relationships between circulating plasma concentrations and duodenal flows of essential amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98: 4707-4734

- Peltonen-Sainio, P., Hannukkala, A., Huusela-Veistola, E., Voutila, L., Niemi, J., Valaja, J., Jauhiainen, L. & Hakala, K. 2013. Potential and realities of enhancing rapeseed- and grain legume-based protein production in a northern climate. *The Journal of Agricultural Science* 151: 303-321
- Pisulewski, P. M., Rulquin, H., Peyraud, J. L. & Verite, R. 1996. Lactational and systemic responses of dairy cows to postruminal infusions of increasing amounts of methionine. *Journal of Dairy Science* 79: 1781-1791
- Puhakka, L., Jaakkola, S., Simpura, I., Kokkonen, T. & Vanhatalo, A. 2016. Effects of replacing rapeseed meal with fava bean at 2 concentrate crude protein levels on feed intake, nutrient digestion, and milk production in cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 99: 7993-8006
- Puhakka, L., Jyrinki, S. & Vanhatalo, A. 2012. Palkoviljojen haitta-aineet ja niiden merkitys kotieläinten ruokinnassa. *Maataloustieteen Päivät 2012: Suomen maataloustieteellisen seuran tiedote*. Toim. Schulman, N. & Kauppinen, H. Helsinki 2012. 6 s.
- Quigley, S., Poppi, D., Budisantoso, E., Dahlanuddin, Marsetyo, McLennan, S., Pamungkas, D., Panjaitan, T. & Priyanti, A. 2009. Strategies to increase growth of weaned Bali calves. Projektin LPS/2004/023 loppuraportti. Australian Centre for International Agricultural Research Publications, Australia. 92 s.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Ashok Kumar, N., Sridhar, S. & Rengasamy, R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* 34: 77-88
- Reboloso-Fuentes, M. M., Navarro-Pérez, A., García-Camacho, F., Ramos-Miras, J. J. & Guil-Guerrero, J. L. 2001. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2966-2972
- Robinson, P. 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
- Sarker, P. K., Gamble, M. M., Kelson, S. & Kapuscinski, A. R. 2016. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. *Aquaculture Nutrition* 22: 109-119
- Singh, J. & Saxena, R. C. 2015. An introduction to microalgae: diversity and significance. Teoksessa: *Handbook of Marine Microalgae - Biotechnology Advances*. Toim. Kim, S. K. Amsterdam: Academic Press. s. 11-24

- Sirakov, I., Velichkova, K. & Nikolov, G. 2012. The effect of algae meal (*Spirulina*) on the growth performance and carcass parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Bioscience and Biotechnology SE/Online*: 151-156.
- 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
- Skrede, A., Mydland, L. T., Ahlstrøm, Ø., Reitan, K. I., Gislerød, H. R. & Øverland, M. 2011. Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *Journal of Animal and Feed Sciences* 20: 131-142
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-68
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 201-211
- Stamm, M. 2015. Effects of different microalgae supplements on fatty acid composition, oxidation stability, milk fat globule size and phospholipid content of bovine milk. *Elintarviketeknologian maisteritutkielma*. Helsingin yliopisto, elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, EMFOL-ohjelma. 86 s.
- Surai, P. F. & Sparks, N. H. C. 2001. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Science & Technology* 12: 7-16
- Tarsia, E. 2016. Rypsin, härkäpavun ja *Spirulina platensis*-mikrolevän vaikutukset lypsylehmien valkuaisen hyväksikäyttöön. *Kotieläinten ravitsemustieteen pro gradu-tutkielma*. Helsingin yliopisto, maataloustieteiden laitos. 60 s.
- 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: 2674-2685
- 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 Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597
- Venkatesan, J., Manivasagan, P. & Kim, S. K. 2015. Marine microalgae biotechnology: present trends and future advances. *Teoksessa: Handbook of Marine Microalgae - Biotechnology Advances*. Toim. Kim, S. K. Amsterdam: Academic Press. s. 1-9
- Wullepit, N., Hostens, M., Ginneberge, C., Fievez, V., Opsomer, G., Fremaut, D. & De Smet, S. 2012. Influence of a marine algae supplementation on the oxidative sta-

tus of plasma in dairy cows during the periparturient period. Preventive Veterinary Medicine 103: 298-303

- Ylinen, V. 2015. Mikrolevä lypsylehmien valkuaisrehuna – vaikutus syöntiin, aineenvaihduntaan ja maidontuotantoon. Kotieläinten ravitsemustieteen pro gradu-tutkielma. Helsingin yliopisto, maataloustieteiden laitos. 63 s.
- Yuan, Y. V. 2008. Marine algal constituents. Teoksessa: Marine Nutraceuticals and Functional Foods. Toim. Barrow, C. & Shahidi, F. Boca Raton: CRC Press. s. 259-296
- Zhu, H., Fievez, V., Mao, S., He, W. & Zhu, W. 2016. Dose and time response of ruminally infused algae on rumen fermentation characteristics, biohydrogenation and *Butyrivibrio* group bacteria in goats. Journal of Animal Science and Biotechnology 7: 22. DOI: 10.1186/s40104-016-0080-1



## Liite 1.

Taulukko 10. Maitorauhasen plasman aminohappojen valtimo-laskimo -erotus ( $\mu\text{mol/L}$ ) maitorauhasessa ja ottotehokkuus (%).

	Koeruokinta				SEM	Merkitsevyys		
	Soija	<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i> + <i>Nanno- chloropsis</i>		Soija vs. mikro- levät	<i>Spirulina</i> vs. <i>Chlorellat</i>	<i>Chlorella</i> vs. <i>Chlorella</i> + <i>Nanno- chloropsis</i>
Havainnot	4	3	3	4				
Valtimo-laskimo -erotus, $\mu\text{mol/L}$								
Aminohapot yhteensä	619	708	685	613	59,8	0,259	0,267	0,231
Haaraketjuiset <sup>1</sup>	175	184	208	173	20,5	0,436	0,753	0,179
Ei-välttämättömät	254	311	281	247	33,8	0,304	0,148	0,305
Välttämättömät	365	398	405	366	33,6	0,336	0,681	0,274
Arginiini	44,6	46,0	39,5	41,1	4,57	0,264	0,059	0,546
Fenyylialaniini	23,3	26,7	25,3	24,9	2,41	0,215	0,455	0,863
Histidiini	15,3	16,7	16,3	16,0	1,02	0,209	0,517	0,762
Isoleusiini	47,7	49,0	57,2	46,2	7,47	0,639	0,729	0,246
Leusiini	64,5	71,5	75,0	65,3	6,82	0,319	0,846	0,244
Lysiini	59,4	67,3	66,0	59,1	3,89	0,125	0,186	0,104
Metioniini	13,1	15,9	13,9	14,2	1,50	0,224	0,253	0,839
Treoniini	31,3	34,9	31,0	32,7	3,25	0,521	0,308	0,583
Tryptofaani	3,26	6,02	4,50	5,09	0,737	0,032	0,165	0,500
Valiini	62,3	63,8	76,1	61,7	6,58	0,389	0,449	0,100
Maitorauhasen ottotehokkuus, %								
Aminohapot yhteensä	24,7	27,4	28,1	25,6	2,17	0,147	0,744	0,230
Haaraketjuiset <sup>1</sup>	28,1	27,3	30,9	26,8	4,24	0,933	0,704	0,380
Ei-välttämättömät	17,9	22,4	20,8	19,2	1,61	0,057	0,139	0,312
Välttämättömät	32,2	33,4	35,9	33,0	3,73	0,485	0,744	0,428
Arginiini	52,5	55,1	53,6	49,5	4,83	0,947	0,256	0,244
Fenyylialaniini	41,2	47,2	47,9	46,5	4,87	0,138	0,987	0,757
Histidiini	24,5	34,8	28,5	40,4	6,29	0,180	0,962	0,221
Isoleusiini	32,4	28,2	34,9	27,1	5,30	0,571	0,578	0,203
Leusiini	41,4	42,4	43,5	41,9	6,35	0,824	0,964	0,831
Lysiini	56,2	60,7	64,2	58,0	4,06	0,153	0,891	0,161
Metioniini	55,4	63,9	70,2	65,3	3,33	0,008	0,215	0,174
Treoniini	24,8	29,0	29,8	28,3	3,50	0,225	0,994	0,728
Tryptofaani	7,58	14,8	12,0	13,0	1,734	0,010	0,191	0,599
Valiini	19,6	19,5	22,6	19,5	2,91	0,673	0,579	0,337

Koekäsittelyissä Soija ja *Chlorella* + *Nannochloropsis* SEM pitää kertoa luvulla 0,8306.<sup>1</sup>Isoleusiini, leusiini ja valiini