

MIKROKITEINEN SELLULOOSA LYPSYLEHMIEN RUOKINNASSA

Anna Lehtinen

Maisterintutkielma

Helsingin yliopisto

Maataloustieteiden osasto

Kotieläinten ravitsemustiede

Tammikuu 2020

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Osasto — Sektion — Department Maataloustieteiden osasto	
Tekijä — Författare — Author Anna Lehtinen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Mikrokiteinen selluloosa lypsylehmien ruokinnassa			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma		Aika — Datum — Month and year Tammikuu 2020	
		Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 39 s.	
Tiivistelmä – Referent - Abstract <p>Märehtijöiden ruoansulatuskanava on erikoistunut hyödyntämään kuitua pääasiallisena energianlähteenään. Nurmikasvien selluloosa ja hemiselluloosa muodostavatkin tyypillisesti merkittävän osan märehtijöiden ravinnosta mutta puupohjaiset aineet eivät ole yleisesti käytettyjä märehtijöiden ruokinnassa. Ruoan- ja rehuntuotannon välinen kilpailu maankäytöstä on globaali haaste, joka lisää kiinnostusta uusia vaihtoehtoisia rehuaineita kohtaan.</p> <p>Mikrokiteisellä selluloosalla (MCC) on monia sovelluksia elintarviketeollisuuden lisäaineena sekä lääketieteellisuuden kantoaineena. <i>In vitro</i> -kokeessa pötsimikrobit ovat hyödyntäneet MCC:a onnistuneesti, mikä viittaa mahdollisuuteen käyttää MCC:a märehtijöiden ruokinnassa. Tässä <i>in vivo</i> -kokeessa tutkittiin havupuusellusta erotetun MCC:n potentiaalia lypsylehmien ruokinnassa. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää MCC:n vaikutus lypsylehmien syöntiin, pötsikäymiseen, maitotuotokseen ja dieetin sulavuuteen. Ravintoaineiden <i>in vivo</i> -sulavuudet laskettiin kahden sisäisen merkkiaineen, happoon liukenemattoman tuhkan (AIA) ja sulamattoman kuidun (iNDF), avulla.</p> <p>Kokeessa käytettiin kolmea seosrehuruokintaa, jotka sisälsivät MCC:a 0 (kontrolli, MCC0), 10 (MCC10) tai 100 g/kg kuiva-ainetta (ka) (MCC100). MCC10-käsittelyssä MCC lisättiin kontrollidieettiin ja MCC100-käsittelyssä MCC korvasi murskattua ohraa. Seosrehun karkea- ja väkirehun suhde oli 50:50, ja lehmät saivat sitä vapaasti. Kokeessa oli 24 vähintään kahdesti poikinutta Nordic Red -lehmää, jotka jaettiin neljään blokkiin poikimakeran ja maitotuotoksen perusteella. Yksi blokki muodostui kuudesta fistelilehmästä. Kokeen alussa lehmien maitotuotos oli keskimäärin 38,9 ± 5,59 kg/pv. Kokeessa oli kaksi 21 vuorokauden jaksoa, jonka alussa oli 14 vuorokauden totuttamisjakso, jota seurasi seitsemän vuorokauden keruujakso.</p> <p>MCC:n neutraalidetergenttikuidun (NDF) pitoisuus oli erittäin korkea (937 g/kg ka), kun taas raakavalkuaispitoisuus (12,5 g/kg ka) ja orgaanisen aineen <i>in vitro</i> -sulavuus (0,404 g/g) olivat matalia, joten MCC:n rehuarvo oli heikko. Lehmien syönti oli keskimäärin 25,6 kg ka/pv eikä dieettien välillä ollut merkitseviä eroja. Pötsin pH:ssa, ammoniakkipitoisuudessa tai haihtuvien rasvahappojen osuuksissa ei ollut merkitseviä eroja dieettien välillä. MCC:n lisääminen dieettiin ei vaikuttanut merkitsevästi orgaanisen aineen tai ka:n sulavuuteen kummallakaan käytetyistä merkkiaineista. Raakavalkuaisen AIA-sulavuus pieneni (p<0,05) mutta NDF:n sulavuus kasvoi merkitsevästi (p<0,001) MCC100-ruokinnalla kontrollidieettiin verrattuna. MCC:n lisääminen heikensi lehmien energiakorjattua maitotuotosta (EKM) sekä rasva- ja valkuaisuutosta (p<0,05). Erot olivat kuitenkin numeerisesti pieniä.</p> <p>Kokeen tulosten perusteella MCC:a voidaan käyttää lypsylehmien ruokinnassa ilman negatiivista vaikutusta eläinten syöntiin, mutta murskattua ohraa korvattaessa se heikentää hieman lehmien EKM-tuotosta. Vastoin hypoteesia MCC:n ei havaittu tasaavan pötsin pH:n vaihteluita tämän kokeen olosuhteissa.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Mikrokiteinen selluloosa, puukuuitu, lypsylehmä, pötsikäyminen, maidontuotanto			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden osasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Tutkimuksen toteutus: Luonnonvarakeskus (Luke), Kaakkois-Suomen ammattikorkeakoulu (XAMK), Kuidun uudet mahdollisuudet -hanke Työn ohjaus: tutkimusprofessori Marketta Rinne, Luke, tutkija Piia Kairenius, Luke ja professori Aila Vanhatalo, Helsingin yliopisto			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Osasto — Sektion — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Anna Lehtinen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Microcrystalline cellulose in dairy cattle feeding			
Oppiaine — Läroämne — Subject Animal nutrition			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year 01/2020	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 39 p.
Tiivistelmä — Referent - Abstract <p>The gastrointestinal tract of the ruminants is specialized to utilize fibre as a main source of energy. Cellulose and hemicellulose from grasses typically compose a considerable part of the feeding of ruminants but wood-based feed ingredients are not commonly used. The competition about land use between food and feed production is a global challenge which increases the interest towards novel feeds.</p> <p>Microcrystalline cellulose (MCC) has many applications in food and pharmaceutical industry. Rumen microbes have been able to utilize MCC <i>in vitro</i> which made it reasonable to expect that they could be used as feed for ruminants. The aim of this <i>in vivo</i> experiment was to investigate the effects of MCC on intake, rumen fermentation, milk production and diet digestibility in dairy cows.</p> <p>This experiment used three total mixed rations (TMRs) which included MCC 0, 10 or 100 g/kg DM (MCC0, MCC10, MCC100). In MCC10-diet MCC was added to control diet and in MCC100 diet MCC replaced rolled barley. The ratio of silage and concentrates in TMR was 50:50 and cows were fed ad libitum. 24 multiparous Nordic Red cows were used in the experiment. Six of the cows were rumen cannulated. The experiment consisted of two 21-day periods. Data and samples were collected during the last seven days of the periods.</p> <p>The NDF content in MCC was very high (937 g/kg DM) but crude protein content (12,5 g/kg DM) and organic matter <i>in vitro</i> digestibility (0,404 g/g) were low. Feed intake of the cows was on average 25.6 kg DM/day and there were no significant differences between the diets. The digestibility of NDF increased in MCC100 diet (p<0.001). The digestibility of organic matter and dry matter were not significantly affected by the diet. Inclusion of MCC decreased the energy corrected milk production of the cows about 1.5 kg/day and it decreased also the fat and protein content of the milk (P<0.05). These deficiencies were however numerically small.</p> <p>Based on the results of this study MCC can be added on the diet of dairy cattle without negative effects on the feed intake but when replacing rolled barley it decreases slightly the production of the energy corrected milk. Positive effects of MCC on the rumen fermentation could not be demonstrated under circumstances of this experiment.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords microcrystalline cellulose, dairy cow, milk production, rumen fermentation, feed intake, novel feeds			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Carrying out of the experiment: Natural Resources Institute Finland (Luke) and South-Eastern Finland University of Applied Sciences (XAMK), Kuidun uudet mahdollisuudet -project Supervisors: Research Professor Marketta Rinne, Principal Specialist Piia Kairenius and Professor Aila Vanhatalo			

Sisällysluettelo

LYHENTEET JA KÄSITTEET	5
1 JOHDANTO	6
2 MIKROKITEINEN SELLULOOSA JA MUUT PUUPOHJAISET REHUAINHEET	7
2.1 Mikrokiteisen selluloosan ominaisuudet ja käyttösovellukset	7
2.2 Mikrokiteinen selluloosa ja muut puupohjaiset rehut eläinten ravitsemuksessa	8
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEEESIT	10
4 AINEISTO JA MENETELMÄT	11
4.1 Koejärjestelyt ja koe-eläimet	11
4.2 Rehut ja ruokinta	12
4.3 Mikrokiteisen selluloosan valmistus	13
4.4 Näytteiden otto ja mittaukset	14
4.4.1 Rehunäytteet	14
4.4.2 Elopaino ja kuntoluokitus	15
4.4.3 Maitonäytteet	16
4.4.4 Sontanäytteet	16
4.4.5 Pötsinestenäytteet	16
4.5 TULOSTEN LASKENTA JA TILASTOLLINEN ANALYYSI	17
5 TULOKSET	20
5.1 Rehujen kemiallinen koostumus ja syönti	20
5.2 Dieettien koostumus ja sulavuus	23
5.3 Pötsikäyminen	25
5.4 Maidontuotanto	26
6 TULOSTEN TARKASTELU	28
6.1 Rehujen kemiallinen koostumus, syönti, ravintoaineiden saanti ja sulavuus	28
6.2 Pötsikäyminen	29
6.3 Maidontuotanto	30
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	32
8 KIITOKSET	33
LÄHTEET	34

LYHENTEET JA KÄSITTEET

MCC	mikrokiteinen selluloosa
AIA	happoon liukenematon tuhka
iNDF	sulamaton kuitu
ka	kuiva-aine
ME	muuntokelpoinen energia
MP	muuntokelpoinen valkuainen; ohutsuolesta imeytyvät aminohapot
NDF	neutraalidetergenttikuitu
ADF	happoliukoinen kuitu
ADL	happoliukoinen ligniini
rv	raakavalkuainen
OIV	ohutsuolesta imeytyvä valkuainen
PVT	pötsin valkuaistase
VFA	haihtuvat rasvahapot
EKM	energiakorjattu maitotuotos
soa	sulava orgaaninen aine

1 JOHDANTO

Märehtijöiden ruoansulatuskanava on erikoistunut hyödyntämään kuitua pääasiallisena energianlähteenään ja nurmikasvien selluloosa ja hemiselluloosa muodostavatkin tyypillisesti merkittävän osan märehtijöiden ravinnosta (Van Soest, 1994). Puupohjaiset aineet eivät ole yleisesti käytettyjä märehtijöiden rehuna mutta niiden ruokinnallista arvoa on tutkittu ja villien märehtijöiden tiedetään käyttävän havupuita talviajan ravintona (Stolter ym., 2009). Käsittelemättömän puun kuiva-aineen sulavuus on erittäin heikko (0,02-0,33 *in vitro*) eikä puu siis ole tehokkaasti eläinten hyödynnettävissä (Millet ym., 1970). Puuaineksen ominaisuuksia voidaan kuitenkin muokata esikäsittelyllä ja esimerkiksi koivun rehuarvoa on onnistuttu parantamaan höyrykäsittelyn avulla (Tesfa ym., 1992; Kaustell & Tuori, 1993). Puu- ja puujohdannaistuotteiden käyttö rehuaineena on sallittu EU:n lainsäädännössä. (Feed Materials Register, 2019).

Globaalien haasteiden kuten ruoan- ja rehuntuotannon välisen maankäytön kilpailun vuoksi kiinnostus uusista vaihtoehtoisista rehuaineista kohtaan on kasvanut. Selluloosa on maailman runsain uusiutuva orgaaninen aine (Habibi ym., 2010), ja maailman suurin hiilihydraattivaranto on puu, joka muodostuu pääasiassa selluloosasta (400-450 g/kg ka), hemiselluloosasta (200-300 g/kg ka) ja ligniinistä (200-300 g/kg ka) (Sjöström, 1993). Selluloosan ja hemiselluloosan ollessa märehtijöiden luontainen energian lähde (Van Soest, 1994) ovat puujohdannaiset erittäin kiinnostava ryhmä uusien rehuaineiden tutkimuksessa eikä niiden käytölle rehuteollisuudessa pitäisi olla suuria biologisia tai eettisiä esteitä.

Yksi näistä puujohdannaisista on selluloosantuotannosta saatava mikrokiteinen selluloosa (MCC). MCC eristetään selluloosan kiteisistä alueista. MCC:a on tutkittu muun muassa elintarvikkeiden terveysvaikutteisena osana ja sen onkin todettu vaikuttavan positiivisesti ruoansulatuskanavan hyvinvointiin (Nsor-Atindana ym., 2017). Joitain tutkimuksia MCC:sta on tehty myös yksimahaisten rehuna mutta MCC:n käytöstä märehtijöiden rehuna ei ennen tätä tutkimusta löytynyt julkaistuja *in vivo* -tutkimuksia. Stefanskin ym. (2018) *in vitro* -kokeessa pötsimikrobit hyödynsivät MCC:a onnistuneesti. Tämä viittasi

mahdollisuuteen käyttää MCC:a yhtenä komponenttina märehitijöiden ruokinnassa. Aiemman tutkimustiedon puutteen vuoksi tämä *in vivo* -koe tarvittiin todentamaan MCC:n vaikutuksia lypsylehmien syöntiin, pötsikäymiseen ja maitotuotokseen sekä dieetin sulavuuteen.

2 MIKROKITEINEN SELLULOOSA JA MUUT PUUPOHJAISET REHUAINHEET

2.1 Mikrokiteisen selluloosan ominaisuudet ja käyttösovellukset

Selluloosa on kasvien soluseinien rakenteelle välttämätön, toistuvista β -D-glukoosiyksiköistä muodostuva biopolymeeri. β -D-glukoosiyksiköt ovat selluloosaketjussa tuolimudossa, viereiseen molekyyliinsä nähden 180° kiertyneenä molekyyliakselinsa ympäri, mikä synnyttää molekyylien välille vahvoja vetysidoksia. Kahta vierekkäistä β -D-glukoosiyksikköä kutsutaan sellobioosiyksiköksi. Selluloosaketju on kemiallisesti asymmetrinen: toinen pää on ei-pelkistävä ja toinen pelkistävä (Habibi ym., 2010). Selluloosassa on järjestäytymättömiä ja järjestäytyneitä alueita eli kristallitteja, jotka vaihtelevat ilman selkeää rajapintaa. Järjestäytymätöntä aluetta kutsutaan amorfiseksi osaksi. Yksi selluloosaketju voi kulkea usean amorfisen ja kiteisen alueen läpi. Yhdensuuntaisista selluloosaketjuista muodostuvat mikrofibrillit muodostavat puuaineen tukirangan, jota mikrofibrillien väleihin asettuvat hemiselluloosa ja ligniini vahvistavat. Hemiselluloosa on useista erilaisista polysakkarideista koostuva heteropolymeeri, joka hajoaa selluloosaa helpommin järjestäytymättömämmän rakenteensa ja pienemmän polymerisaatioasteensa vuoksi. Hemiselluloosa hydrolysoituu monomeereiksi happojen vaikutuksesta. Havupuissa merkittävin hemiselluloosa on galaktoglukomannaani (Sjöström, 1993).

Mikrokiteistä selluloosaa voidaan valmistaa kaikesta lignoselluloosasta, joka sisältää kiteistä selluloosaa (Vanhatalo, 2017). Eristämällä kiteistä fraktiota voidaan tuottaa erikokoisia ja -muotoisia toiminnallisia aineita kuten MCC:a (Habibi ym., 2010). FAO:n (2018) määritelmän mukaan MCC on osittain depolymerisoitunutta selluloosaa, joka valmistetaan käsittelemällä kasvimateriaalista saatavaa α -selluloosaa epäorgaanisilla hapoilla. MCC:n polymerisaatioaste on tavallisesti alle 400, ja alle 5 μm partikkelikokoa

on enintään 10 % aineen massasta. Aalto-yliopisto on kehittänyt ja patentoinut tavan tuottaa MCC:a (AaltoCell™) tehokkaasti pehmeästä puusellusta taloudelliset ja ympäristötekijät huomioiden (Vanhatalo ja Dahl, 2014). Hiilihydraattien lisäksi MCC sisältää myös vaihtelevan määrän (10-40 %) ligniiniä (Vanhatalo ym., 2014). Ligniinin, selluloosan ja hemiselluloosan väliset sidokset heikentävät hiilihydraattien saatavuutta pötsin mikro-organismeille (Van Soest, 1994).

MCC on kemiallisesti epäaktiivinen ja sillä on hyvät sidosominaisuudet, mikä on mahdollistanut sen moninaisen hyödyntämisen muun muassa sidosaineena ja tuotteen koostumukseen vaikuttavana tekijänä lääke- ja elintarviketeollisuudessa (Habibi ym., 2010). MCC:a on hyödynnetty myös funktionaalisissa elintarvikkeissa (Nsor-Atindana ym., 2017) ja komposiittiteollisuudessa (Habibi ym., 2010). Lisääntynyt kiinnostus MCC:a kohtaan on noussut sen ihmisen ruoansulatuselimistössä havaittujen positiivisten vaikutusten takia sekä rotilla tutkittujen, verestä rasvaa poistavien ominaisuuksien vuoksi (Nsor-Atindana ym., 2017). Myös tarve löytää uusiutuvia, eettisempiä raaka-aineita eri alojen teollisuudelle lisää kiinnostusta MCC:n tutkimiseen (Habibi ym., 2010).

2.2 Mikrokiteinen selluloosa ja muut puupohjaiset rehut eläinten ravitsemuksessa

Selluteollisuuden sivuvirrat ovat usein läpikäyneet ainakin osittaisen delignifikaation ja sisältävät prosessista riippuen vain hemiselluloosaa tai hemiselluloosaa ja selluloosa sekä vaihtelevan määrän tai eivät lainkaan ligniiniä (Rinne ja Kuoppala, 2019). Kasvien soluseinäainesta tehokkaasti hyödyntävillä märehtijöillä ligniinin rakenne ja sen väliset sidokset hiilihydraattien kanssa vaikuttavat siihen, kuinka paljon ligniini rajoittaa soluseinäaineen sulavuutta (Jung ja Deetz, 1993). Puuaineksessa yksi yleisimmistä ligniinin ja hiilihydraattien välisistä sidoksista on bentsyylietterisidos (Jeffries, 1990), ja eetterisidosten on havaittu olevan hajoamattomia anaerobisissa olosuhteissa (Jung ja Allen, 1995), mikä saattaa vähentää puuaineen hajoamista pötsissä. Pötsimikrobit pystyvät kuitenkin hajottamaan bentsyylietterisidoksia myös anaerobisissa olosuhteissa pötsinesteessä (Kajikawa ym., 2000). Ligniinin negatiivisia vaikutuksia puuaineksen sulavuuteen on pyritty vähentämään esimerkiksi biologisella sieniesikäsittelyllä

(Okano ym., 2005) ja kemiallisilla esikäsitteilyillä (Shrivastava ym., 2012). Soluseinän rakenneosat voidaan tuoda paremmin pötsimikrobien saataville myös fysikaalisen esikäsitteilyn kuten jauhamisen tai höyrytyksen avulla (Hendriks ja Zeeman, 2009). Puusta kuuman veden ja paineen avulla erotetun hemiselluloosan sulavuus on todettu kohtuulliseksi (Rinne ym., 2016). Kaireniuksen ym. (2019) kokeessa männynkuori (noin 1 tai 2 kg/pv) lisäsi korkeatuottoisten lypsylehmien kuiva-aineen syöntiä mutta vähensi niiden maito-, valkuais- ja rasvatuotoksia. Rehut olivat maittavia mutta tuotantovaikutuksien ja hyvin matalan energia-arvon vuoksi männynkuorta ei voitu suositella korvaamaan perinteisiä rehuaineita korkeatuottoisilla lypsylehmillä. Puumelassi- ja puusokeriväkirehuja on syötetty kasvaville naudoille ja lypsylehmille onnistuneesti 10 % kuiva-aineen saannista (Zinn ym., 1990, 1993; Herrick ym., 2012).

Ennen tätä tutkimusta ei MCC:n käytöstä märehitijöiden ruokinnassa löytynyt yhtään julkaistua *in vivo* -tutkimusta. MCC:n vaikutuksista yksimahaisten eläinten terveyteen ja tuotantoparametreihin on kuitenkin muutamia tutkimuksia (Takahashi ym., 2005; Wu ym., 2016), joista voidaan arvioida mahdollisia vaikutuksia myös märehitijöillä. Wu ym. (2016) havaitsivat viiden prosentin MCC-lisän laskevan plasman kokonaiskolesterolin ja LDL-lipoproteiinin (low-density lipoprotein) pitoisuuksia kasvavilla sioilla. Kokeessa MCC ei vaikuttanut veriseerumin insuliini- tai leptiinipitoisuuksiin mutta laski paastamiseen liittyvää glukagonipitoisuutta. Laskenut glukagonipitoisuus voisi viitata MCC:n kykyyn laskea veren sokeripitoisuutta. MCC ei vaikuttanut sikojen seerumin triglyseridi-pitoisuuksiin. Nsor-Atindanan ym. (2017) mukaan MCC:n hypolipidemiset ja -glykeemiset ominaisuudet voisivat perustua dieetin energiasisällön rajoittamiseen sulamattomalla kuidulla. Toisessa tutkimuksessa (Lu ym., 2015) hypokolesterolisen vaikutuksen pääteltiin johtuvan kuidun aiheuttamista muutoksista lipoproteiinien tai sappihappojen metaboliaan, suolistossa tapahtuvaan imeytymiseen tai käymisreaktion sivutuotteisiin ja näiden aiheuttamiin muutoksiin maksan kolesterolisynteesissä. Hypolipidemisten ja -glykeemisten vaikutusten parempi tunteminen vaatii lisää tutkimuksia, mutta nämä ovat tärkeitä ominaisuuksia lihavuuden ja sokeritaudin hallinnassa. Sulamattoman kuidun kuten MCC:n on todettu ehkäisevän lihavuutta sulavaa kuitua tehokkaammin (Li ym., 2016).

Sulamatonta kuitua voidaan käyttää dieetissä lisäämään eläinten suoliston hyvinvointia ravintokuidun heikommasta sulavuudesta ja muiden ravintoaineiden sulavuutta heikentävistä ominaisuuksista huolimatta (Jha ja Berrococo, 2011). Kuitu tukee suoliston normaalia käymistoimintaa edistämättä ammoniakkin tuotantoa. MCC:n sulavuus yksimahaisilla on rajoittunutta (Bianchi ja Capurso, 2002). Rotilla MCC:n on todettu olevan sulamatonta ylemmässä ruoansulatuskanavassa ja osittain käymiskelpoista paksu- ja umpisuolella (Paturi ym., 2010). MCC:n sulavuusominaisuudet riippuvat kuitenkin sen fyysio-kemikaalisista ominaisuuksista, jotka vaihtelevat raaka-aineiden ja valmistusprosessien välillä (Nsor-Atindana ym., 2017). AaltoCell™ sisältää myös sulamatonta ligniiniä, joten sen sulavuuden voidaan olettaa olevan pienempi kuin puhtaalla MCC:lla. MCC:n on todettu lisäävän paksusuolen lyhytketjuisten rasvahappojen (SCFA) pitoisuutta siolla (Wu ym., 2016). Myös *in vitro* -kokeessa sinimailasesta erotetulla MCC:lla ruokittujen kaniin umpisuolen sisällön käymisessä syntyneen SCFA:n määrä oli huomattava (Yang ym., 2010). Umpisuolella tapahtuvan MCC:n käymisen pääasiallisia lopputuotteita ovat haihtuvat rasvahapot (VFA) etikka-, propioni- ja voihappo (Yang ym., 2010; Zhou ym., 2014). Fermentaatiossa syntyy myös muita metaboliitteja kuten maitohappoa, pyruvaattia, vetyä ja sukkiinaattia (Gibson, 1999).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET JA HYPOTEESIT

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää MCC:n vaikutus lypsylehmien syöntiin, pötsikäymiseen, maitotuotokseen ja dieetin sulavuuteen *in vivo* -kokeessa. Kokeessa MCC:n matalammalla 10 g/kg ka ruokintatasolla oli tarkoitus havainnoida MCC:n ominaisuuksia rehun lisäaineena ja korkeammalla tasolla 100 g/kg ka sen ominaisuuksia uutena rehuaineena. Tutkimushypoteeseinä olivat maidontuotannon säilyminen samalla tasolla verrattuna kontrollidieettiin, joka ei sisältänyt MCC:a sekä MCC:n positiivinen vaikutus pötsikäymiseen tasaten pH:n vaihteluita pötsissä.

Tämä tutkimus oli osa Kaakkois-Suomen ammattikorkeakoulun (XAMK) Kuuma (Kuidun uudet mahdollisuudet) -projektia, jota rahoittivat Euroopan unioni, Euroopan aluekehitysrahasto (EAKR), Andritz Oy,

Boreal Bioref Oy, Laitex Oy ja AGS Finland Oy. Luonnonvarakeskus (Luke) toimi projektissa rehukäyttötutkimusten toteuttajana.

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Koejärjestelyt ja koe-eläimet

Koe tehtiin Luken Jokioisten tutkimusnavetalla 14.4. – 25.5.2018. Koejärjestelyiden suhteen noudatettiin Suomen ja EU:n lainsäädäntöä (kansallinen lainsäädäntö ”laki tieteellisiin tai opetustarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 497/2013” ja EU direktiivi 2010/63/EU). Kokeessa oli 24 Nordic Red -lehmää, joista kuudella oli pysyvä pötsifisteli (Bar Diamond Inc, Parma, ID, USA). Kaikki lehmät olivat poikineet vähintään kahdesti, keskimäärin $3,3 \pm 1,13$ kertaa ja ohittaneet tuotoskauden huipun. Lehmien poikimisesta oli kokeen alussa kulunut keskimäärin $176 \pm 59,3$ päivää ja lehmien maitotuotos oli keskimäärin $38,9 \pm 5,59$ kg/pv. Kokeen alussa lehmien elopaino oli keskimäärin $682 \pm 63,9$ kg ja kunto-
luokka (asteikko 1-5) keskimäärin $3,2 \pm 0,34$. Lehmät jaettiin neljään kuuden lehmän blokkiin poikimakeran, maitotuotoksen ja lypsykauden vaiheen perusteella. Yksi blokki muodostui fistelilehmistä.

Lehmät olivat kokeen ajan pihatossa, jossa niiden tunnistus lypsyasemalla, vaa’alla ja ruokinta-alueella tapahtui kaulapannan transponderin avulla. Navetassa oli käytössä ruokintajärjestelmä, jossa jokaiselle lehmälle oli määritetty ruokintapöydällä oma paikka, ja johon vain kyseinen lehmä pääsi syömään. Tämä mahdollisti lehmien yksilöllisen syönnin mittaamisen. Koe-eläimet oli merkitty myös nilkkapanoilla tunnistuksen helpottamiseksi.

Change-over tyyppinen koemalli sisälsi kolme koekäsittelyä ja kaksi 21 vuorokauden jaksoa. Kaikki lehmät eivät siis käyneet läpi kaikkia koekäsittelyitä. Jaksojen alussa oli 14 vuorokauden totuttamisjakso, jota seurasi seitsemän vuorokauden datan ja näytteiden keruujakso.

4.2 Rehut ja ruokinta

Kokeen koekäsittelyinä oli kolme erilaista seosrehuruokintaa, jotka sisälsivät MCC:a 0 (kontrolli, MCC0), 10 (MCC10) tai 100 g/kg kuiva-ainetta (ka) (MCC100). MCC100-koedieeteissä MCC:lla korvattiin murskattua ohraa, ja MCC10-koedieetissä MCC lisättiin kontrollidieettiin. Karkea- ja väkirehun suhde seosrehussa oli 50:50 (Taulukko 1) ja lehmät saivat sitä vapaasti (vähintään 5 % tähteitä päivittäin). MCC100-dieetin raakavalkuaispitoisuus säädettiin samaksi kuin muilla dieeteillä nostamalla rypsirouheen osuutta ja muuttamalla hieman viljojen osuutta dieetissä. Näin dieettien ohutsuolesta imeytyvä valkuainen (OIV) ja pötsin valkuaisase (PVT) pyrittiin säilyttämään samalla tasolla. Väkirehukomponentit pelletöitiin Luken rehusekoittamossa MCC:a lukuun ottamatta komponenttien täsmällisen annostelun varmistamiseksi.

MCC0- ja MCC10-käsittelyiden lehmät saivat kontrolliseosrehua, joka jaettiin automaattisella rehunjako-vaunulla (TR ruokintarobotti, Pellon Group Oy, Ylihärmä) neljä kertaa päivässä noin klo 7, 13, 16 ja 18. Seosrehu sekoitettiin kiinteässä seosrehusekoittimessa, josta se siirrettiin hihnaa pitkin rehunjako-vaunuun. MCC10-käsittelyn lehmien MCC-annos jaettiin ja sekoitettiin vaunun jakamaan kontrolliseosrehuannokseen käsin kaksi kertaa päivässä noin klo 7:30 ja 18:30. MCC100-käsittelyn koeseosrehu sekoitettiin traktorikäyttöisellä seosrehuvaunulla, jonne lisättiin myös MCC. MCC100-koeseosrehu jaettiin vaakakärryjen avulla käsin neljästi päivässä samaan aikaan seosrehuvaunun kierroksien kanssa. Lisäksi lehmät saivat lypsyasemalta 0,6 kg Luken rehusekoittamolla pelletöityä houkutusväkirehua (taulukko 1) kaksi kertaa päivässä. Vettä eläimet saivat vapaasti.

Seosrehuun käytettiin vuoden 2017 ensimmäisen sadon säilörehua, joka oli timotein (*Phleum pratense*) ja nurminadan (*Festuca pratensis*) seos. Kevyesti esikuivattu ja tarkkuussilputtu rehu oli korjattu Jokioi-

silla (60°49'N, 23°28'E) ja säilötty aumassa. Rehuun oli lisätty korjuun yhteydessä 5 l/t muurahaishappopohjaista säilöntäainetta (AIV2 Plus, Eastman Chemical Company, Oulu,), joka sisälsi 760 g/kg muurahaishappoa ja 55 g/kg ammoniumformiaattia.

Taulukko 1. Seosrehujen ja houkutusrehun koostumus (g/kg ka¹).

	Seosrehut ²			Houkutus-rehu
	MCC0	MCC10	MCC100	
Mikrokiteinen selluloosa (MCC)	0	10	100	0
Ohra	110	109	0	310
Kaura	90	89	68	0
Vehnä	50	50	30	190
Sokerijuurikasleike	60	59	75	120
Rypsirouhe	177	175	214	355
Kivennäiset ³	13	13	13	25
Nurmisäilörehu	500	495	500	-

¹Kuiva-aine

²MCC0=Kontrollidieetti, MCC10=dieetti, joka sisälsi 10 g MCC/kg ka, MCC100=dieetti, joka sisälsi 100 g MCC/kg ka

³Kivennäisseos (Lypsykivennäinen Tiineys+, Hankkija Oy, Hyvinkää) sisältö Ca (210 g/kg), P (15 g/kg), Mg (90 g/kg), Na (95 g/kg), Se (3bE8, 20 mg/kg; 3b8.11, 10 mg/kg), E-vitamiini (3a700; 2000 mg/kg) ja biotiini (3a880; 30 mg/kg)

4.3 Mikrokiteisen selluloosan valmistus

Tutkimuksessa käytetty MCC AaltoCell™ tuotettiin Aalto-yliopiston kahteen patentoituun keksintöön perustuvalla menetelmällä. Raaka-aineena käytettiin valkaisematonta havupuusellua, joka kerättiin massanvalmistuslinjalta painekeiton jälkeen ennen valkaisu vaihetta. Sellumassa, jonka kuiva-ainepitoisuus oli 80 g/kg, happamoihin pH-arvoon 1,8 ja syötettiin jatkuvatoimiseen keittimeen, jossa hydrolyysi tapahtui 165 °C lämpötilassa. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Tästä syntynyt MCC pestiin pH-arvoon 3,5 ja sakeutettiin suotonauhapesurilla kuiva-ainepitoisuuteen 270 g/kg.

MCC valmistettiin XAMK:n kuitulaboratoriossa Savonlinnassa useassa erässä ja kuljetettiin Lukelle ruokintatutkimusta varten muutaman viikon sisällä valmistuksesta. Kokeessa MCC:a käytettiin kosteassa muodossa valmistusprosessin pitkittymisen ja kustannusten nousun välttämiseksi sekä MCC:n toiminnallisten ominaisuuksien mahdollisten muutosten välttämiseksi. MCC:n laatu pysyi stabiilina eikä se osoittanut pilaantumisen merkkejä tutkimuksen aikana. MCC muodosti seosrehuun sekoitettaessa isompia paakkuja, jotka eivät sekoittuneet täysin muiden rehuaineiden kanssa. Tästä huolimatta seosrehu oli tarpeeksi tasalaatuista, eivätkä lehmät juurikaan erotelleet MCC:a muiden rehuaineiden joukosta.

4.4 Näytteiden otto ja mittaukset

4.4.1 Rehunäytteet

Data ja näytteet kerättiin kummankin jakson viimeisellä viikolla (keruuviikko) päivinä 15 – 21. Seosrehun tähteet punnittiin vaakakärryn avulla päivittäin. Keruuviikoilla nurmisäilörehusta kerättiin päivittäin näyte, jotka jakson päätteeksi yhdistettiin ja varastoitiin -20 °C:ssa kemiallisia analyysseja varten. Sulatetut näytteet kuivattiin 60 °C:ssa ja jauhettiin 1 mm:n seulan läpi. Tästä näytteestä analysoitiin sekundäärinen kuiva-aine (ka), tuhka, raakavalkuainen (rv), neutraalidetergenttikuitu (NDF), käymislaatu (pH, ammonium-N (g/kg kokonais N), maitohappo, etikkahappo, propionihappo, voi-happo, etanoli ja vesiliukoiset hiilihydraatit), orgaanisen aineen sulavuus *in vitro* sekä happoliukenematon tuhka (AIA) ja sulamaton kuitu (iNDF). Myös väkirehuista otettiin keruuviikoilla päivittäiset näytteet, jotka yhdistettiin jakson päätyttyä. Näytteistä analysoitiin sekundäärinen ka, tuhka, rv, raakarasva, NDF, AIA ja iNDF. Keruuviikolla päivittäin otetut MCC-näytteet yhdistettiin jakson päätteeksi. Näytteistä analysoitiin primäärinen ja sekundäärinen ka, tuhka, rv, NDF, happoliukoinen kuitu (ADF), happoliukoinen ligniini (ADL), orgaanisen aineen *in vitro* -sellulaasisulavuus, AIA ja iNDF. Valmiista MCC0- ja MCC100-seosrehusta analysoitiin kuiva-aine.

Primäärinen kuiva-aine määritettiin kuivaamalla näytteitä 20 tunnin ajan 105 °C:ssa, ja säilörehun kapitoisuus korjattiin Huidan ym. (1986) mukaisesti. Rehujen tuhkapitoisuus määritettiin polttamalla näytteitä 600 °C:ssa kahden tunnin ajan. Typpipitoisuus määritettiin Dumasin menetelmällä (Leco FP-428 nitrogen analyser, Leco Corporation, St Joseph, USA) ja rv-pitoisuus saatiin kertomalla typpipitoisuus luvulla 6,25. Väkirehujen raakarasva määritettiin HCl-hydrolyysin jälkeen eetteriuutolla (Anon, 1971). NDF analysoitiin Van Soestin ym. (1991) mukaan ja ADF analysoitiin Robertsonin ja Van Soestin (1981) mukaan amylaasilla tärkkelystä sisältävistä rehuista. ADF- ja NDF-pitoisuudet esitetään tutkimuksessa ilman jäännöstuhkaa. ADL analysoitiin AOAC metodilla 973.18 (AOAC 1990).

Säilörehun ja MCC:n *in vitro* -sulavuus määritettiin Nousiaisen ym. (2003) mukaan pepsiinisellulaasi-menetelmällä. Sellulaasiliukoisuus muunnettiin orgaanisen aineen sulavuudeksi Huhtasen ym. (2006) ensimmäisen sadon nurmisäilörehun kaavan mukaisesti ja MCC:lle käytettiin yleistä kaavaa. Huomioimalla tuhkapitoisuus laskettiin tästä sulavan orgaanisen aineen pitoisuus rehun kuiva-aineessa (D-arvo). Säilörehusta analysoitiin myös VFA (Huhtanen ym., 1998), maitohappo (Haacker et al., 1983), vesiliukoiset hiilihydraatit (Somogyi, 1945) ja ammoniumtyppi (McCullough, 1967). Säilörehun sulamaton NDF (iNDF) määritettiin *in situ* -nailonpussimenetelmällä (Ahvenjärvi ym., 2000) uittaen näytteitä lehmän pötsissä 12 vuorokauden ajan.

4.4.2 Elopaino ja kuntoluokitus

Lehmät punnittiin automaattisesti joka lypsykerran jälkeen staattisella vaa'alla (Pellon Group Ltd, Ylihärmä, Finland). Laskuissa käytettiin aamu- ja iltahavaintojen keskiarvoa. Lehmät kuntoluokitettiin asteikolla 1-5 ja intervallina käytettiin lukua 0,25 (Edmonson ym., 1989). Kuntoluokitus tehtiin tutkimuksen alussa sekä kummankin jakson päätteeksi.

4.4.3 Maitonäytteet

Lehmät lypsettiin kahdesti päivässä noin klo 7:00 ja klo 16:30 2 x 6 paikkaisella tandem-aseamalla. Lehmien yksilöllinen maitotuotos tallentui automaattisesti jokaiselta lypsyltä mutta tilastollisessa analyysissä käytettiin vain keruuviikon tuloksia. Jakson kahdelta viimeiseltä päivältä eli neljältä viimeiseltä lypsykerralta kerättiin maitonäytteet rasvan, valkuaisen, laktoosin, urean ja kuiva-aineen analyysiä varten. Näiden pitoisuudet laskettiin painotettuna keskiarvona maitotuotoksen mukaan. Valkuainen, rasva, laktoosi, urea ja kuiva-aine analysoitiin Valio Oy:n laboratoriossa Seinäjoella MilkoScan FT6000 infrapuna-analysaattorilla (Foss Electric, Hillerød, Denmark) ja soluluku Fossomatic analysaattorilla (Foss Electric, Hillerød, Denmark).

4.4.4 Sontanäytteet

Keruuviikolla MCC0- ja MCC100-käsittelyiden eläimiltä kerättiin sontanäytteet spot-näytteinä suoraan peräsuolesta. Näytteet kerättiin lypsyjen yhteydessä kahdesti päivässä päivinä 17-20. Näytteet kerättiin 500 ml muovirasioihin ja pakastettiin välittömästi. Analyyseja varten yhden lehmän näytteet samalta jaksolta (8 kpl) yhdistettiin, kuivattiin ja jauhettiin 1 mm seulalla. Näytteistä määritettiin primaarinen ja sekundaarinen ka, tuhka, typpi, NDF, iNDF ja AIA. Dieettien sulavuudet laskettiin käyttäen AIA:a ja iNDF:a rehun sisäisinä merkkiaineina.

4.4.5 Pötsinestenäytteet

Pötsinestenäytteet otettiin kuudesta pötsifistelöidystä eläimestä keruuviikon viidentenä päivänä 1,5 tunnin välein klo 06:00-16:30. Ensimmäinen näyte otettiin ennen aamulypsyä sekä -ruokintaa ja viimeinen näyte ennen iltalypsyä. Näytteet laitettiin välittömästi ottamisen jälkeen jäähauteeseen, jossa ne kuljetettiin Luken laboratorioon. Näytteet sentrifugoitiin 4 °C:sta nopeudella 3000 rpm 15 minuutin ajan ja jaettiin kolmeen osaan pH:n, ammoniumtypen (NH₃-N) ja haihtuvien rasvahappojen määrittystä

varten. pH määritettiin välittömästi. VFA-määrittystä varten pipetoitiin 5 ml pötsinestettä ja 0,5 ml kylästettyä elohopeakloridiliuosta pieneen muovipulloon. Sekoituksen jälkeen pulloon lisättiin 2 ml 1 N natriumhydroksidia (40 g NaOH/1000 ml H₂O) ja sekoitettiin. Ammoniumtypen määrittämiseksi 0,3 ml 50 % rikkihappoa (H₂SO₄) ja 15 ml pötsinestettä pipetoitiin pieneen muovipulloon ja sekoitettiin. Näytteet pakastettiin välittömästi sekoittamisen jälkeen –20 °C myöhemmin tapahtuvia analyysyjä varten.

4.5 TULOSTEN LASKENTA JA TILASTOLLINEN ANALYYSI

Tulosten laskentaan käytettiin molempien jaksojen keruuviikon tuloksia. Orgaanisen aineen määrä rehussa ja sonnassa laskettiin kuiva-aineen ja tuhkan erotuksena.

Nurmisäilörehun sulavan orgaanisen aineen osuus kuiva-aineesta (D-arvo) laskettiin kaavalla:

$$\text{orgaanisen aineen sulavuus (oas) } in \text{ vitro} \times \text{ orgaanisen aineen pitoisuus (g/kg ka)}$$

Nurmisäilörehun muuntokelpoisen energian (ME) sisältö laskettiin kaavalla:

$$0,016 \times \text{rehuannoksen D-arvo (MAFF, 1975)}$$

Ravintoaineiden *in vivo* -sulavuudet laskettiin käyttäen sisäisenä merkkiaineena AIA:a (Van Keulen ja Jung, 1977) ja iNDF:a (Huhtanen ym., 1994). Kuiva-aineen, orgaanisen aineen ja raakavalkuaisen näennäinen sulavuus sekä NDF:n sulavuus laskettiin kaavalla:

$$\text{ravintoaineen sulavuus} = 1 - (\text{merkkiaineen pitoisuus rehussa} / \text{merkkiaineen pitoisuus sonnassa}) \times (\text{ravintoaineen pitoisuus sonnassa} / \text{ravintoaineen pitoisuus dieetissä}),$$

jossa merkki- ja ravintoaineen pitoisuuksien yksikkö g/kg ka.

Väkirehujen ME-sisältö laskettiin sulavista ravintoaineista (MAFF, 1975; MAFF, 1984) ja väkirehukomponenttien sulavuuskertoimet saatiin rehutaulukoista (Luke, 2019). Ohutsuolesta imeytyvät aminohapot (ohutsuolesta imeytyvä valkuainen; OIV) ja pötsin valkuaisase (PVT) laskettiin suomalaisen valkuaisarvojärjestelmän mukaisesti (Luke, 2019). Typenkäytön tehokkuus maidontuotannossa määritettiin maidossa eritetyn typen määrän suhteena eläimen typen saantiin (kg maidon N/kg syöty N).

Energiakorjattu maitotuotos (EKM) laskettiin Sjaunjan ym. (1990) mukaan.

$$\text{EKM (kg)} = \text{maitotuotos} \times (38,3 \times \text{rasvapitoisuus} + 24,2 \times \text{valkuaispitoisuus} + 16,54 \times \text{laktoosipitoisuus} + 20,7) / 3140.$$

Rehunkäytön tehokkuuden määrittämistä varten ME:n saanti arvioitiin kolmella eri tavalla. Korjaamaton ME-saanti (ME_{TAB}) laskettiin kertomalla rehujen ME-arvoina (MJ/kg ka) käytetyt rehutaulukkoarvot rehujen syönnillä (Luke, 2019).

Korjattu ME-saanti (ME_{COR}) laskettiin kaavalla (Luke, 2019):

$$\text{Korjattu ME-saanti (MJ/pv)} = \text{korjaamaton ME-saanti (MJ/pv)} - (-56,7 + 6,99 \times \text{ME}_{\text{yp}} + 1,621 \times \text{ka-syönti} - 0,44595 \times \text{rv-pit} + 0,00112 \times \text{rv-pit}^2),$$

jossa ka-syönti = kuiva-aineen syönti, kg/pv, ME_{yp} = rehuannoksen korjaamaton ME-pitoisuus, MJ/kg ka ja rv-pit = rehuannoksen raakavalkuaispitoisuus, g/kg ka.

Korjausyhtälö ottaa huomioon syöntitason ja dieetin sulavuuden negatiivisen yhdysvaikutuksen. Käytetyn kaavan mukaan ka-syönti ja dieetin ME-pitoisuus vaikuttavat dieetin sulavuuteen negatiivisesti, kun taas dieetin raakavalkuaispitoisuus vaikuttaa hiukan positiivisesti.

Lisäksi eläinten ME-saanti arvioitiin sisäisten merkkiaineiden AIA ja iNDF avulla laskettuun orgaanisen aineen näennäiseen sulavuuteen perustuen (MAFF, 1975; MAFF, 1984). Tutkimuksessa ME:n saannille

kaikilla dieeteillä käytettiin arvoa 16 MJ ME/kg soa. MCC10-käsittelyn sulavuutta ei mitattu vaan sille käytettiin MCC0-dieetin keskiarvoa.

Tilastollinen analyysi suoritettiin SAS 9.4 version Mixed-proseduurilla (SAS Institute, Cary, NC, USA). Varianssianalyysien tilastomalli oli seuraava:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + C(B)_j + P_k + T_l + \varepsilon_{ijkl},$$

jossa μ on keskiarvo, B_i blokki, $C(B)_j$ eläimen vaikutus (satunnaistekijä), P_k jakson vaikutus, T_l käsittelyn vaikutus (kiinteä tekijä) ja ε_{ijkl} virhetermi. Pötsinesteanalyysissä malliin lisättiin näytteenoton ajankohta:

$$Y_{ijklm} = \mu + B_i + C(B)_j + P_k + T_l + H_m + (TH)_{lm} + \varepsilon_{ijklm},$$

jossa μ on keskiarvo, B_i blokki, $C(B)_j$ eläimen vaikutus (satunnaistekijä), P_k jakson vaikutus, T_l käsittelyn vaikutus (kiinteä tekijä), H_m ajankohdan vaikutus, $(TH)_{lm}$ käsittelyn ja ajankohdan yhdysvaikutus ja ε_{ijklm} virhetermi

Käsittelyiden vaikutusten neliösummat jaettiin edelleen kontrasteihin MCC-lisän lineaarisen (P_L) ja käyräviivaisen (P_Q) merkitsevyyden selvittämiseksi. Kontrastien kertoimet säädettiin vastaamaan epätasavälisiä MCC:n lisäystasoja.

Merkitsevyyden raja-arvoina käytettiin tilastollisessa analyysissä P-arvoja, joista $P < 0,001$ on erittäin merkitsevä, $P < 0,01$ on hyvin merkitsevä, $P < 0,05$ on merkitsevä ja $P < 0,1$ on suuntaa antava.

5 TULOKSET

5.1 Rehujen kemiallinen koostumus ja syönti

Kokeessa käytetty nurmisäilörehu oli energia-arvoltaan (D-arvo 682 g/kg ka) ja säilöntälaadultaan (pH<4 ja ammoniakkityppeä 54 g/kg kokonaistyyppä) hyvää (taulukko 2). NDF-kuidun pitoisuus oli MCC:ssa erittäin korkea, kun taas tuhka- ja rv-pitoisuus sekä orgaanisen aineen *in vitro* -sulavuus olivat matalia. Näin ollen myös MCC:n rehuarvot olivat matalia muihin rehuihin verrattuna. Onnistuneen MCC:n tuotantoprosessin ansiosta MCC:n happodetergenttiligniinin pitoisuus oli matala, ja näin ollen sen selluloosapitoisuus oli hyvin korkea.

Taulukko 2. Koerehujen kemiallinen koostumus.

	Nurmi- säilörehu ¹	Väkirehu ² MCC0, MCC10	Väkirehu MCC100 ³	Houkutus- rehu ⁴	MCC ⁵
Kuiva-aine (ka), g/kg	217	879	878	876	286
Kuiva-aineessa, g/kg					
Tuhka	92	84	83	74	1,2
Raakavalkuainen	133	207	243	213	12,5
Raakarasva	40	34	34	30	-
Neutraalidetergenttikuitu (NDF)	513	263	244	216	937
Happodetergenttikuitu (ADF)	301	-	-	-	892
Happodetergenttiligniini (ADL)	27	-	-	-	23
Hemiselluloosa (NDF – ADF)	212	-	-	-	45
Selluloosa (ADF - ADL)	274	-	-	-	869
Sulamaton kuitu (iNDF)	76	79	97	61	-
Oa:n ⁶ sulavuus <i>in vitro</i> , g/g	0,751	-	-	-	0,404
D-arvo ⁷ , g/kg ka	682	-	-	-	404
Rehuarvot					
ME ⁸ , MJ/kg ka	10,9	11,8	11,8	12,2	6,5
OIV ⁹ , g/kg ka	81	127	126	123	41
PVT ¹⁰ , g/kg ka	12	50	47	40	-50

¹pH 3,99, ammonium-N (g/kg kokonais N) 54, maitohappo 84 g/kg ka, etikkahappo 18 g/kg ka, propionihappo 1,0 g/kg ka, voihappo 0,05 g/kg ka, etanoli 8,8 g/kg ka, vesiliukoiset hiilihydraatit 58 g/kg ka

²MCC0=kontrollidieetti ilman MCC lisää, MCC10=dieetti, jossa MCC:a 10 g/kg ka

³MCC100=dieetti, jossa MCC:a 100 g/kg ka

⁴Lypsyn yhteydessä saatu houkutusrehu

⁵Mikrokiteinen selluloosa

⁶Orgaaninen aine

⁷Sulavan orgaanisen aineen osuus kuiva-aineesta

⁸Muuntokelpoinen energia

⁹Ohutsuolesta imeytyvät aminohapot

¹⁰Pötsin valkuaistase

Koerhut olivat eläinten kuiva-aineen kokonaissyönnin perusteella maittavia, sillä syönti oli korkea kaikilla dieeteillä (taulukko 3) syönnin keskiarvon ollessa 25,6 kg ka/pv. Numeerisesti eniten (26,0 kg ka/pv) söivät MCC100-dieetin eläimet mutta ero muihin koekäsittelyihin ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Eläinten NDF:n saanti lisääntyi lineaarisesti ($P_L < 0,001$) dieetin MCC:n osuuden noustessa. Eläinten orgaanisen aineen tai raakavalkuaisen saannissa ei ollut koekäsittelyiden välillä merkitseviä eroja. Raakasvan saanti väheni lineaarisesti ($P_L < 0,001$) MCC:n osuuden kasvaessa dieetissä. Eläinten korjattu ME-saanti väheni lineaarisesti ($P_L < 0,02$) dieetin MCC:n osuuden kasvaessa mutta iNDF-sulavuustulosten avulla laskettu ME-saanti kasvoi ($P_L < 0,03$) varsinkin tasolta MCC10 tasolle MCC100 siirryttäessä (+14 MJ/pv). Myös AIA-sulavuustulosten perusteella laskettu ME-saanti kasvoi numeerisesti tasolta MCC10 tasolle MCC100 siirryttäessä (+7 MJ/pv) mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Eläinten OIV:n saannissa ei dieettien välillä ollut tilastollisesti merkitseviä eroja mutta numeerisesti korkein OIV-saanti oli kontrollidieetin eläimillä. MCC100-dieetin eläimillä oli korkein pötsin valkuaistase ($P_L < 0,01$).

Taulukko 3. Mikrokiteisen selluloosan (MCC) vaikutus lehmien syötiin ja ravintoaineiden saantiin.

	MCC:n osuus dieetissä, g/kg kuiva-ainetta (ka)			SEM	Tilastollinen merkitsevyys ¹	
	0	10	100		L	Q
Syöti, kg ka/pv						
Kokonaissyöti	25,4	25,2	26,0	0,43	0,197	0,650
Nurmisäilörehu	12,4	12,2	12,8	0,22	0,139	0,391
Väkirehut	12,9	12,7	10,7	0,19	<0,001	0,975
MCC	0	0,252	2,557	0,040	<0,001	0,919
Väkirehut+MCC	12,9	13,0	13,2	0,22	0,273	0,963
Orgaaninen aine	23,3	23,1	23,9	0,40	0,214	0,680
Raakavalkuainen	4,33	4,25	4,32	0,073	0,863	0,469
Raakarasva	0,960	0,943	0,852	0,015	<0,001	0,753
Neutraalidetergenttikuitu	9,52	9,59	11,7	0,187	<0,001	0,574
ME ² saanti, MJ/pv						
ME _{TAB} ³	291	287	280	4,8	0,146	0,698
ME _{COR} ⁴	270	267	263	4,1	0,018	0,434
ME _{AIA} ⁵	268	267	274	4,4	0,292	0,768
ME _{iNDF} ⁶	238	239	253	4,6	0,022	0,958
Valkuaisen saanti, g/pv						
OIV ⁷	2563	2526	2541	42,8	0,897	0,570
PVT ⁸	636	611	670	11,3	0,006	0,092

¹ MCC-lisän vaikutuksen lineaarinen (L) ja käyräviivainen (Q) merkitsevyys

²Muuntokelpoinen energia

³ME_{TAB}=korjaamaton ME-saanti, (Luke, 2019)

⁴ME_{COR}=korjattu ME-saanti (Luke, 2019)

⁵ME_{AIA}=yksilöllisten AIA-sulavuustulosten avulla laskettu ME-saanti (MCC0-eläinten keskiarvoa käytettiin MCC-10 eläimille)

⁶ME_{iNDF}= yksilöllisten iNDF-sulavuustulosten avulla laskettu ME-saanti (MCC0-eläinten keskiarvoa käytettiin MCC-10 eläimille)

⁷Ohutsuolesta imeytyvät aminohapot

⁸Pötsin valkuaistase

SEM=keskiarvon keskivirhe

5.2 Dieettien koostumus ja sulavuus

MCC:n osuuden noustessa dieetissä orgaanisen aineen ja raakavalkuaisen pitoisuudet dieetissä vähenivät käyräviivaisesti mutta erot olivat numeerisesti pieniä ($P_Q < 0,001$) (taulukko 4). Raakarasvan pitoisuus dieetissä väheni hieman siirryttäessä tasolta MCC0 tasolle MCC10 (-0,4 g/kg ka) mutta huomattavasti siirryttäessä tasolta MCC10 tasolle MCC100 (-4,7 g/kg ka) ($P_Q < 0,001$). Dieetin NDF-pitoisuus lisääntyi huomattavasti MCC100-käsittelyllä ($P_Q < 0,001$). MCC:n osuuden kasvaessa dieetin korjaamaton ($P_Q < 0,001$) ja korjattu ($P_L < 0,001$) ME-pitoisuus laski. MCC:n osuuden nouseminen dieetissä lisäsi dieetin ME_{iNDF} -pitoisuutta ($P_L < 0,01$) mutta ei vaikuttanut ME_{AIA} -pitoisuuteen. Dieetin ohutsuoilesta imeytyvän valkuaisen pitoisuus laski hieman MCC:n osuuden kasvaessa ($P_Q < 0,001$). Pötsin valkuaistase nousi hieman tasolla MCC100 tasoon MCC0 verrattaessa ($P_Q < 0,001$).

Taulukko 4. Dieettien koostumus.

	MCC ¹ :n osuus dieetissä, g/kg kuiva-aine			SEM	Tilastollinen merkitsevyys ²	
	0	10	100		L	Q
Orgaaninen aine	918	916	917	0,059	<0,001	<0,001
Raakavalkuainen	171	169	166	0,133	<0,001	<0,001
Raakarasva	37,8	37,4	32,7	0,007	<0,001	<0,001
Neutraalidetergenttikuitu	375	381	451	0,446	<0,001	0,017
ME_{TAB} ³	11,5	11,4	10,8	0,001	<0,001	<0,001
ME_{COR} ⁴	10,6	10,6	10,1	0,017	<0,001	0,325
ME_{AIA} ⁵	10,6	10,6	10,5	0,04	0,244	0,426
ME_{iNDF} ⁶	9,4	9,5	9,7	0,07	0,003	0,319
OIV ⁷	101	100	97,6	0,041	<0,001	<0,001
PVT ⁸	25,1	24,3	25,7	0,084	<0,001	<0,001

¹Mikrokiteinen selluloosa

² MCC-lisän vaikutuksen lineaarinen (L) ja käyräviivainen (Q) merkitsevyys

³ ME_{TAB} =korjaamaton ME-saanti, (Luke, 2019)

⁴ ME_{COR} =korjattu ME-saanti (Luke, 2019)

⁵ ME_{AIA} =yksilöllisten AIA-sulavuustulosten avulla laskettu ME-saanti (MCC0-eläinten keskiarvoa käytettiin MCC-10 eläimille)

⁶ME_{iNDF}= yksilöllisten iNDF-sulavuustulosten avulla laskettu ME-saanti (MCC0-eläinten keskiarvoa käytettiin MCC-10 eläimille)

⁷Ohutsuolesta imeytyvät aminohapot

⁸Pötsin valkuaistase

SEM=keskiarvon keskivirhe

MCC100-dieetillä NDF:n näennäinen sulavuus kasvoi kontrollidieettiin verrattuna sekä AIA- että iNDF-merkkiaineiden avulla laskettuna ($P < 0,001$) (taulukko 5). MCC:n lisääminen dieettiin ei vaikuttanut merkittävästi orgaanisen aineen tai kuiva-aineen sulavuuteen. Numeerisesti orgaanisen aineen sulavuus laski hieman tasolta MCC0 tasolle MCC100 siirryttäessä (-0,004) AIA-sulavuustulosten perusteella mutta nousi (+0,016) iNDF-sulavuustulosten perusteella. AIA-sulavuustulosten mukaan MCC:n osuuden kasvattaminen dieetissä vähensi raakavalkuaisen sulavuutta ($P < 0,05$).

Taulukko 5. Sisäisten merkkiaineiden happoon liukenematon tuhka (AIA) ja sulamaton kuitu (iNDF) avulla laskettu dieetin näennäinen sulavuus lehmillä, joiden dieetti sisälsi mikrokiteistä selluloosaa (MCC) 0 tai 100 g/kg kuiva-aine (ka).

	MCC:n osuus dieetissä, g/kg		SEM	Tilastollinen merkitsevyys
	kuiva-ainetta			
	0	100		
Kuiva-aine				
AIA	0,701	0,697	0,0029	0,439
iNDF	0,617	0,635	0,0078	0,216
Orgaaninen aine				
AIA	0,721	0,717	0,0028	0,383
iNDF	0,643	0,659	0,0072	0,211
Raakavalkuainen				
AIA	0,678	0,662	0,0035	0,037
iNDF	0,587	0,593	0,0093	0,690
Neutraalidetergenttikuitu				
AIA	0,603	0,669	0,0056	<0,001
iNDF	0,496	0,601	0,0087	<0,001

SEM=keskiarvon keskivirhe

5.3 Pötsikäyminen

Pötsin pH, ammoniakkipitoisuus, haihtuvien rasvahappojen pitoisuus ja osuudet eivät eronneet koekäsittelyiden välillä tilastollisesti merkitsevästi (taulukko 6). Pötsin ammoniakkipitoisuus näytti kuitenkin nousevan hieman tasolta MCC0 tasolle MCC10 siirryttäessä (0,07 mmol/l) ja enemmän tasolta MCC10 tasolle MCC100 siirryttäessä (1,2 mmol/l). Näytteiden keruu-aika vaikutti haihtuvien rasvahappojen määrää lukuun ottamatta kaikkiin pötsikäymisen parametreihin merkitsevästi mutta ajan ja koekäsittelyn välillä ei havaittu merkitsevää yhdysvaikutusta.

Taulukko 6. Mikrokiteisen selluloosan (MCC) vaikutus pötsikäymiseen.

	MCC:n osuus dieetissä, g/kg kuiva-ainetta			SEM	Tilastollinen merkitsevyys		
	0	10	100		Lineaarinen	Aika	Käsittely × aika
pH	6,22	6,17	6,28	0,089	0,669	0,043	0,267
Ammoniakki-N, mmol/l	3,84	3,91	5,11	0,751	0,085	<0,001	0,612
VFA ¹ , mmol/l	126,9	127,9	127,7	2,55	0,914	0,154	0,327
Osuus VFA:sta							
Etikkahappo (A)	0,633	0,628	0,630	0,0048	0,832	<0,001	0,303
Propionihappo (P)	0,191	0,191	0,189	0,0052	0,657	<0,001	0,284
Voihappo (B)	0,136	0,132	0,135	0,0037	0,947	0,016	0,139
A+B/P	4,10	4,01	4,08	0,146	0,841	<0,001	0,285
A/P	4,67	4,77	4,69	0,142	0,872	<0,001	0,094

¹Haihtuvat rasvahapot

SEM=keskiarvon keskivirhe

5.4 Maidontuotanto

MCC100-dieetti vähensi lehmien EKM-tuotosta kontrolliruokintaan verrattuna 1,5 kg/pv ($P_L < 0,03$) (taulukko 7). MCC:n lisääminen dieettiin pienensi myös eläinten rasva- ($P_L < 0,04$) ja valkuaistuotoksia ($P_L < 0,001$). Korkeimmalla MCC:n lisäystasolla myös valkuaisen ($P_L < 0,01$) ja urean ($P_L < 0,05$) pitoisuudet maidossa pienenevät. MCC:lla ei ollut merkitsevää vaikutusta eläinten maitotuotokseen, maidon rasva-, laktoosi- tai kuiva-ainepitoisuuksiin tai typen käytön tehokkuuteen maidontuotannossa.

Syötyä kuiva-ainekiloa kohti tuotetun EKM:n määrä väheni korkeimmalla MCC-tasolla kontrolliruokintaan verrattuna 0,09 kg ($P = 0,01$). Keskimäärin lehmät tuottivat 1,42 kg EKM/kg syötyä ja korjattu ME-saanti (ME_{COR}) sekä sisäisten merkkiaineiden avulla arvioitu ME-saanti (ME_{AIA} , ME_{iNDF}) huomioiden 0,14 kg EKM/kg saatua ME. Tuotetun EKM:n määrä saatua ME:a kohti väheni vain hieman tasolta MCC0 tasolle MCC10 siirryttäessä (-0,01 kg) mutta hieman enemmän tasolta MCC10 tasolle MCC100 siirryttäessä (-0,012 kg/MJ) ($P_L < 0,001$), kun muuntokelpoisen energian saanti laskettiin iNDF-sulavuustulosten avulla. Myös AIA-sulavuustulosten perusteella laskettua muuntokelpoisen energian saantia kohti tuotettu EKM väheni tasolta MCC10 tasolle MCC100 siirryttäessä hieman (-0,008 kg) ($P_L < 0,02$). Eläinten energiatase näytti nousevan MCC100-dieetillä etenkin tasolta 10 tasolle 100 siirryttäessä mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

Taulukko 7. Mikrokiteisen selluloosan (MCC) vaikutus maidontuotantoon, maidon koostumukseen ja rehun hyväksikäyttöön maidontuotannossa.

	MCC:n osuus dieetissä, g/kg kuiva-ainetta (ka)			SEM	Tilastollinen merkitsevyys ¹	
	0	10	100		L	Q
Tuotokset						
Maito, kg/pv	34,7	35,6	34,7	0,40	0,074	0,885
EKM ² , kg/pv	36,8	36,6	35,3	0,45	0,024	0,977
Rasva, g/pv	1499	1500	1442	20,2	0,039	0,818
Valkuainen, g/pv	1290	1290	1231	15,5	0,008	0,783
Laktoosi, g/pv	1575	1548	1518	20,2	0,094	0,477
Maidon koostumus, g/kg						
Rasva	42,0	42,3	41,8	0,45	0,615	0,703
Valkuainen	36,2	36,5	35,7	0,13	0,003	0,129
Laktoosi	44,0	43,5	43,7	0,18	0,554	0,072
Kuiva-aine	13,3	13,3	13,2	0,50	0,117	0,654
Urea, mg/100 ml	25,3	25,3	23,6	0,02	0,015	0,888
Typen käytön tehokkuus³						
kg EKM/kg kuiva-aineen saanti	0,297	0,304	0,286	0,0054	0,062	0,329
kg EKM/ME _{COR} ⁴ saanti	0,136	0,137	0,135	0,0022	0,517	0,650
kg EKM/ME _{AIA} ⁵ saanti	0,137	0,137	0,129	0,0022	0,011	0,744
kg EKM/ME _{INDF} ⁶ saanti	0,154	0,153	0,141	0,0027	0,001	0,957
Energiatase _{COR} ⁷	12,9	10,3	13,0	3,66	0,795	0,615
Energiatase _{AIA}	11,4	10,6	24,4	3,88	0,014	0,708
Energiatase _{INDF}	-18,7	-17,0	3,8	4,12	0,001	0,921

¹MCC-lisän vaikutuksen lineaarinen (L) ja käyräviivainen (Q) merkitsevyys

²EKM=Energiakorjattu maitotuotos

³Typen käytön tehokkuus (kg N maidossa/syöty kg N)

⁴ME_{COR}=korjattu muuntokelpoisen energiansaanti (Luke, 2019)

⁵ME_{AIA}= yksilöllisten AIA-sulavuustulosten avulla laskettu ME-saanti (MCC0-eläinten keskiarvoa käytettiin MCC10-eläimille)

⁶ME_{INDF}= yksilöllisten INDF-sulavuustulosten avulla laskettu ME-saanti (MCC0-eläinten keskiarvoa käytettiin MCC10 eläimille)

⁷Energiatase laskettiin vähentämällä maidontuotantoon ja ylläpitoon vaadittu energia eläimen energian saannista (ME_{COR} , ME_{AIA} tai ME_{iNDF}). Maidontuotantoon ($5,15 \times EKM$, kg) ja ylläpitoon ($0,515 \times elopaino \text{ kg}^{0,75}$) käytetty ME (MJ) laskettiin Luken (2019) mukaisesti.

SEM=keskiarvon keskivirhe

6 TULOSTEN TARKASTELU

6.1 Rehujen kemiallinen koostumus, syönti, ravintoaineiden saanti ja sulavuus

Tutkimuksessa selvitettiin MCC:n vaikutusta lypsylehmien syöntiin ja dieetin sulavuuteen *in vivo* -kokeessa. Aiempia julkaistuja tutkimuksia, jossa MCC:a olisi käytetty lypsylehmien ruokinnassa, ei löydetty. Koska MCC:n vaikutuksista lypsylehmiin ei ollut aiempaa tietoa, lisättiin sitä dieetteihin maltillisesti. Kokeessa MCC:n matalammalla 10 g/kg ka ruokintatasolla oli tarkoitus havainnoida MCC:n ominaisuuksia rehun lisäaineena ja korkeammalla tasolla 100 g/kg ka sen ominaisuuksia uutena rehuaineena. Tämän tutkimuksen tulokset tarjoavat täysin uudenlaista tietoa, jota voidaan hyödyntää puupohjaisten rehuaineiden tutkimuksessa sekä kehityksessä. Kokeen aikana eläimissä ei havaittu poikkeuksellisia ongelmia syönnissä, terveydessä, käytöksessä tai tuotannossa. NDF:n saanti lisääntyi eläimillä odotetusti MCC:a lisättäessä, koska tärkkelyspitoinen ohra korvautui NDF-pitoisella MCC:lla.

MCC:n energia-arvo jäi heikoksi MCC-fraktioiden matalaan *in vitro* -sellulaasiliukoisuuteen perustuvien sulavuusarvojen vuoksi. Tavallinen arvo nurmisäilörehulle on 757 g/kg orgaanista ainetta (Huhtanen ym., 2006), ja MCC:n arvot olivat hiukan yli 400 g/kg orgaanista ainetta, mikä vastaa Stefanskin ym. (2018) saamia sulavuustuloksia. Nurmisäilörehun ja MCC:n tulokset eivät kuitenkaan ole täysin verrattavissa, koska solunsisällysaineiden (1000 - NDF) todellinen sulavuus on lähes täydellistä. Solunsisällysaineet muodostavat noin 50 % säilörehun kuiva-aineesta. Jos oletamme niiden sulavuudeksi 100 %, säilörehun NDF:n sellulaasiliukoisuus olisi noin 500 g/kg orgaanista ainetta, mikä ei enää ole paljon korkeampi verrattuna MCC:n arvoon. Lisäksi AIA-sulavuustuloksien perusteella MCC100-dieetin NDF-sula-

vuus oli korkeampi kuin MCC0-dieetillä, jolloin MCC:n NDF:n sulavuutta voidaan pitää hyvänä. Huolimatta MCC:n *in vitro* -sulavuutta paremmista *in vivo* -sulavuustuloksista eläinten EKM-tuotos heikkeni MCC:a lisättäessä. Perinteiset rehuanalysimenetelmät eivät välttämättä sovi sellaisenaan uusien, epätavallisten rehuaineiden kuten MCC:n analysointiin, ja ainakin tulosten analysointiin tulee kiinnittää erityistä huomiota.

Tässä kokeessa suurin osa eläinten syötiin tunnetusti vaikuttavista ruokinnallisista tekijöistä, kuten säilörehun ja väkirehun osuus ruokinnassa sekä säilörehun sulavuus ja käymislaatu (Huhtanen ym., 2011), pysyi vakioina. Huhtasen ym. (2011) mukaan muun kuin ruokinnan säilörehuosan kuitupitoisuuden nousun pitäisi heikentää kuiva-aineen syöntiä, mitä ei havaittu tässä kokeessa MCC:n lisäämisestä huolimatta. Numeerisesti MCC100-dieetillä kuiva-aineen syönti oli suurin, mikä johtuu luultavasti MCC:n kuidun hyvästä pötsisulavuudesta, joka on havaittu myös aiemmassa *in vitro* -kokeessa (Stefanski ym., 2018). Lisäksi lehmät pystyvät rajoitetusti lisäämään syöntiään täyttääkseen energiantarpeensa dieetin muuttuessa niukemmin energiaa sisältäväksi (McDonald ym., 2011).

Typen ja fosforin hyväksikäytön tehostaminen maidontuotannossa on keskeinen tavoite maidontuotannon ympäristövaikutusten vähentämisessä. Mikäli ruokinta sisältää tarpeettoman korkean pitoisuuden näitä ravintoaineita, voitaisiin MCC:a käyttää vähentämään esimerkiksi ruokinnan typpisisältöä. Näin ollen sen avulla voitaisiin myös tehostaa typen hyväksikäyttöä maidontuotannossa, sillä typen hyväksikäyttö on eniten riippuvainen eläinten typen saannista (Huhtanen ym., 2008).

6.2 Pötsikäyminen

Subakuutti pötsiasidoosi eli piilevä hapanpötsi on yleinen ongelma korkeatuottoisissa lypsykarjoissa, joissa dieetti sisältää runsaasti nopeasti fermentoituvia hiilihydraatteja kuten viljan tärkkelystä suhteessa kuidun määrään (Krause ja Oetzel, 2006). Normaalisti lehmien pötsin pH vaihtelee (pH-arvo 6,4-6,8), mutta piilevässä hapanpötsissä eläimen pötsin pH on päivässä usean tunnin alle 5,8 (Gozho ym.,

2005). Tässä tutkimuksessa MCC:n odotettiin tasaavan pötsin pH:n vaihteluita ohran tärkkelyksen korvautuessa sulavalla kuidulla. Tällaista vaikutusta ei kuitenkaan pystytty osoittamaan eikä koedieettien pötsikäymisen parametreissa ollut tilastollisesti merkitseviä eroja kontrolliruokintaan verrattuna. Tämä johtuu mahdollisesti MCC:n pienestä partikkelikoosta ja hyvästä sulavuudesta. Lisäksi tämän kokeen dieettien maltillisen väkirehumäärän ja riittävän NDF-sisällön myötä minkään dieetin eläimien pötsin pH ei vastannut pötsiasidoosia. Mikäli MCC:a tutkittaisiin hapanpötsistä kärsivillä eläimillä, saattaisi se vaikuttaa positiivisesti eläinten pötsikäymiseen. Koeasetelma oli maltillinen, koska aiempia kokemuksia MCC:n käytöstä lypsylehmiä ruokinnassa ei ollut. Tämän kokeen eläimet ruokittiin pientä määrää houkutusrehua lukuun ottamatta seosrehulla, mutta erillisruokinnan on todettu lisäävän riskiä hapanpötsin muodostumiseen (Krause ja Oetzel, 2006). Mikäli seosrehun koostumus olisi ollut haasteellisempi pötsin normaalin pH:n säilyttämiseksi esimerkiksi sisältäen enemmän väkirehua ja vähemmän kuitua tai MCC:a lisättäisiin erillisruokittujen eläinten väkirehuannokseen, voisi MCC kenties rajoittaa pötsin pH:n liikaa happamoitumista.

MCC:n vaikutuksia pötsin metaanintuotantoon ei seurattu tässä kokeessa mutta aiemmassa *in vitro* -kokeessa (Stefanski ym., 2018) havaittiin, että MCC:lla voisi olla myös pötsin metaanintuotantoa vähentävä vaikutus. MCC:n vaikutus märehittäjien pötsikäymiseen voisi siis olla toinen potentiaalinen näkökulma MCC:n mahdollisille jatkotutkimuksille.

6.3 Maidontuotanto

Tutkimushypoteesi oli maidontuotannon säilyminen samalla tasolla verrattuna kontrollidieettiin, joka ei sisältänyt MCC:a. MCC-tasolla 10 g/kg maidontuotannossa ei ollut eroja kontrollidieettiin verrattuna (P -arvo $>0,05$). MCC-lisän negatiivinen vaikutus eläinten maidontuotantoon ei seurannut kuiva-aineen ja orgaanisen aineen sulavuustuloksia, joihin MCC-lisä ei vaikuttanut merkitsevästi. MCC:n määrän lisääntyessä dieetissä valkuaisen ja urean pitoisuudet maidossa vähenivät lineaarisesti ($P_L < 0,01$; $P_L < 0,02$), mikä seurasi AIA-menetelmän perusteella raakavalukuaisen sulavuuden heikkenemisestä MCC:a lisättäessä. Korjatun ME:n saannin perusteella valkuaispitoisuuden lasku liittyisi vähentyneeseen

ME:n saantiin mutta sisäisten merkkiaineiden sulavuustulosten perusteella lehmien ME:n saanti ei vähentynyt MCC:a lisättäessä. Erot maidontuotannon parametreissä olivat kuitenkin numeerisesti pieniä.

Tässä kokeessa lehmien korjattu ME:n saanti kasvoi MCC:a lisättäessä, mutta maidontuotanto heikkeni, vaikka lehmien energian saanti on yksi maidontuotantoon eniten vaikuttavista tekijöistä (Huhtanen ja Nousiainen, 2012). Erot maidontuotannossa olivat kuitenkin numeerisesti pieniä, ja osa muutoksesta voitaisiin selittää suurempana kudoksiin varastoituneena energiana, sillä lehmien kuntoluokka näytti numeerisesti kasvavan enemmän dieetillä, jossa oli MCC:a. Orgaanisen aineen AIA-sulavuustulosten perusteella laskettua energian saantia on käytetty yleisesti energian saannin arvioinnissa. Tässä kokeessa koekäsittelyillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa mutta numeerisesti MCC100-dieetillä orgaanisen aineen AIA-sulavuus oli hiukan matalampi verrattuna MCC0-dieettiin, kun taas iNDF-sulavuus oli päin vastoin MCC100-dieetillä hiukan korkeampi verrattuna MCC0-dieettiin. iNDF-menetelmän tiedetään aliarvioivan sulavuutta verrattuna kokonaiskeruuseen ja AIA-menetelmään kuten tässäkin kokeessa. Tässä kokeessa orgaanisen aineen AIA-sulavuustulokset korreloivat iNDF-tuloksia paremmin maidontuotannon tulosten kanssa toisin kuin Savosen ym. (2020) kokeessa, jossa iNDF-tulokset korreloivat parhaiten maitotuotoksen kanssa.

MCC-lisän seurauksena pienenevää dieetin rv-pitoisuutta pyrittiin korvaamaan lisäämällä ruokintaan rypsiä, mutta MCC100-dieetin rv-pitoisuus jäi 3 % matalammaksi verrattuna MCC0-dieettiin. Eläinten raakavalkuaisen saanti eri dieeteillä oli kuitenkin yhtä suuri, ja MCC100-dieetin valkuaisesta suurempi osa tuli rypsiä verrattuna MCC0-dieettiin, jossa suurempi osa tuli ohrasta. Tämän pitäisi vaikuttaa positiivisesti maidontuotantoon (Ahvenjärvi ym., 1999) MCC100-dieetissä. Näin ollen raakavalkuaisen saantikaan ei selitä MCC100-käsittelyn negatiivisia vaikutuksia maidontuotantoon. Typen käytön tehokkuus vaikutti numeerisesti laskevan hieman MCC100 dieetillä kontrollidieettiin verrattuna ($P_L=0,062$).

Laskettuja rehuarvoja käytettäessä tehokkuus muuntaa ME:a EKM:ksi ei eronnut koekäsittelyiden välillä mutta käytettäessä dieetin orgaanisen aineen sulavuutta, muuntotehokkuus laski MCC:a lisättäessä. Orgaanisen aineen sulavuus perustuu kokeen mittauksiin, ja sen pitäisi näin olla luotettavampi, mutta on vaikea selittää miksi MCC-lisä olisi heikentänyt energiankäytön tehokkuutta.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkielman tavoitteena oli selvittää MCC:n vaikutus lypsylehmien syöntiin, pötsikäymiseen ja maidontuotantoon. Tämä tutkimus oli löydetyn tiedon perusteella ensimmäinen julkaistu *in vivo* -koe, jossa MCC:a käytettiin lypsylehmien ruokinnassa.

Kokeen tulosten perusteella MCC:a voidaan lisätä lypsylehmien ruokintaan ilman negatiivisia vaikutuksia eläinten syöntiin, mutta korvatessaan ruokinnassa murskattua ohraa ruokintatasolla 100 g/kg ka se vähensi eläinten energiakorjattua maitotuotosta noin 1,5 kg/pv. Tässä kokeessa vallitsevissa olosuhteissa MCC:n ei havaittu olevan eduksi eläinten pötsikäymiselle vastoin hypoteesia. MCC:n mahdolliset positiiviset vaikutukset voitaisiin saada esille, mikäli sitä käytettäisiin jo hapanpötsistä kärsivien eläinten ruokinnassa. Tästä tarvittaisiin lisätutkimusta eläimillä, joiden pötsin pH-taso on laskenut esimerkiksi dieetin sisältämien helposti sulavien hiilihydraattien kuten tärkkelyksen ja sokerin liian saannin vuoksi. Mahdollisia lisätutkimuksen aiheita ovat myös MCC:n vaikutus märehitijöiden metaanipäästöihin ja yksimahaisten eläinten suoliston hyvinvointiin. Lisäksi olisi hyvä tutkia suurinta mahdollista MCC-annosta, joka lehmille olisi turvallista syöttää ilman negatiivisia vaikutuksia esimerkiksi eläinten terveyteen. MCC voidaan nimittäin nähdä myös mahdollisena karkearehujen korvaajana hätätilanteissa, joissa tarpeeksi karkearehua ei ole saatavilla esimerkiksi sään ääri-ilmiöistä johtuvan heikon karkearehusadon vuoksi.

8 KIITOKSET

Työni ohjauksesta haluan kiittää tutkimusprofessori Marketta Rinnettä, tutkija Piia Kaireniusta sekä professori Aila Vanhataloa. Lisäksi kiitän lähipiiriäni kannustuksesta ja kärsivällisyydestä kirjoitusprosessin aikana.

Kiitos myös Lukelle, Kaakkois-Suomen ammattikorkeakoululle ja Kuidun uudet mahdollisuudet -projektin rahoittajille, jotka mahdollistivat tämän tutkimuksen: Euroopan unioni, Euroopan aluekehitysrahasto (EAKR), Andritz Oy, Boreal Bioref Oy, Laitex Oy ja AGS Finland Oy.

LÄHTEET

Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P. & Varvikko, T. 1999. Effects of supplementation of a grass silage and barley diet with urea, rapeseed meal and heat-moisture treated rapeseed cake on milk production and omasal digesta flow in lactating dairy cows. *Acta Agricultura Scandinavica, Section A, Animal Science* 49: 179-189.

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.

Anon. 1971. Determination of crude oils and fats. *Official Journal of European Community Legislations* 297: 995-997.

AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA. 1298 s. ISBN 0-935584-42-0.

Bianchi, M. & Capurso, L. 2002. Effects of guar gum, ispaghula and microcrystalline cellulose on abdominal symptoms, gastric emptying, oro-caecal transit time and gas production in healthy volunteers. *Digestive and Liver Disease* 34: 129-133.

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 Feed Materials Register. 2019. Viitattu 15.10.2019. Saatavissa: <http://www.feedmaterialsregister.eu>.

FAO, 2018. Viitattu 15.10.2019. Saatavissa: <http://www.fao.org/docrep/w6355e/w6355e0l.htm>
http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-280.pdf

Gibson, G.R. 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *Journal of Nutrition* 129: 1438-1441.

- Gozho, G.N., Plaizier, J.C., Krause, D.O., Kennedy, A.D. & Wittenberg, K.M. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *Journal of Dairy Science* 88: 1399-1403.
- Haacker, K., Block, H.J. & Weissbach, F. 1983. Zur kolorimetrischen Milchsäurebestimmung in Silagen mit p-Hydroxydiphenyl. *Archiv für Tierernährung*, 33: 505-512.
- Habibi, Y., Lucian, A. & Rojas, O.J. 2010. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly and applications. *Chemical Reviews* 110: 3479-3500.
- Hendriks, ATWM & Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100: 10-18.
- Herrick, K.J., Hippen, A.R., Kalscheur, K.F., Anderson, J.L., Ranatunga, S.D., Patton, R.S. & Abdullah, M. 2012. Lactation performance and digestibility of forages and diets in dairy cows fed a hemicellulose extract. *Journal of Dairy Science* 95: 3342-3353.
- Huhtanen, P.J., Blauwiel, R. & Saastamoinen, I. 1998. Effects of intraruminal infusions of propionate and butyrate with two different protein supplements on milk production and blood metabolites in dairy cows receiving grass silage based diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 213-222.
- 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., Nousiainen, J.I., Rinne, M., Kytölä, K. & Khalili, H. 2008. Utilization and partition of dietary nitrogen in dairy cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 91: 3589-3599.
- Huhtanen, P., Rinne, M., Mäntysaari, P. & Nousiainen, J. 2011. Integration of the effects of animal and dietary factors on total dry matter intake of dairy cows. *Animal* 5: 691-702.
- Huida, L., Väätäinen H. & Lampila, M. 1986. Comparison of dry matter contents in grass silage as determined by oven drying and gas chromatographic water analysis. *Annales Agriculturae Fenniae* 25: 215-230.
- Jeffries, T.W. 1990. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* 1: 163-176.

- Jha, R., & Berrocoso, J.D. 2015. Review: Dietary fiber utilization and its effects on physiological functions and gut health of swine. *Animal* 9: 1441-1452.
- Jung, H.G. & Allen, M.S. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal of Animal Science* 73: 2774-2790.
- Jung, H.G. & Deetz, D.A. 1993. Cell wall lignification and degradability. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* p: 315-346. Eds. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. & Ralph, J. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Kairenius, P., Mäntysaari, P. & Rinne, M. 2020. The effect of gradual dietary bark meal supplementation on milk production of dairy cows fed a grass silage-based diet. *Animal Feed Science and Technology* 259 (2020).
- Kajikawa, H., Kudo, H., Kudo, T., Jodai, K., Honda, Y., Kuwahara, M. & Watanabe, T. 2000. Degradation of benzyl ether bonds of lignin by ruminal microbes. *FEMS Microbiology Letters* 187: 15–20.
- Kaustell, K. & Tuori, M. 1993. The effect of steam exploded birch wood to milk yield and composition and energy balance of dairy cows given grass silage ad libitum. *World Conference on Animal Production, Edmonton, Canada*. pp. 348-349.
- Krause, K.M. & Oetzel, G.R. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science Technology* 126: 215-236.
- Li, X., Guo J., Ji, K. & Zhang, P. 2016. Bamboo shoot fiber prevents obesity in mice by modulating the gut microbiota. *Scientific Reports* 6: pp.32953.
- Lu, H., Gui, Y., Guo, T., Wang, Q. & Liu, X. 2015. Effect of the particle size of cellulose from sweet potato residues on lipid metabolism and cecal conditions in ovariectomized rats. *Food & Function* 6: 1185-1193.
- Luke. 2019. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset. Viitattu 30.07.2019. Saatavissa: <https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Rehutaulukot>.
- MAFF. 1975. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Teoksessa: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Technical Bulletin, No. 33. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK.

- MAFF. 1984. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Teoksessa: ADAS Reference Book, No. 433. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinical Chemica 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*. 7th ed. Harlow, England: Pearson. 692 s.
- Millett, M.A., Baker, A.J., Fenst, W.C., Mellenberger, R.W. & Slatter, L.D. 1970. Modifying the wood to increase it's in vitro digestibility. *Journal of Animal Science* 31: 781-788.
- 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.
- Nsor-Atindana, J., Chen, M., Goff, H.D., Zhong, F., Sharif, H.R., & Li, Y. 2017. Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food. *Carbohydrate Polymers* 172: 159-174.
- Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y. & Watanabe, T. 2005. Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Animal Feed Science and Technology* 120: 235-243.
- Paturi, G., Butts, C., Monro, J., Nones, K., Martell, S., Butler, R. & Sutherland, J. 2010. Cecal and colonic responses in rats fed 5 or 30% corn oil diets containing either 7.5% broccoli dietary fiber or microcrystalline cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 6510-6515.
- Rinne, M., Kautto, O., Kuoppala, K., Ahvenjärvi, S., Willför, S., Kitunen, V., Ilvesniemi, H. & Sormunen-Cristian, R. 2016. Digestion of wood-based hemicellulose extracts as screened by in vitro gas production method and verified in vivo using sheep. *Agricultural and Food Science* 25: 13-21.
- Rinne, M. & Kuoppala, K. 2019. Feeds for ruminants from forests? (Proceedings of the 10th Nordic Feed Science Conference, June 11 – 12 2019, Uppsala, Sweden). s. 79-86.

Robertson, J.B. & Van Soest, P.J. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. Teoksessa: James, W.D.T. & Theander, O. (toim.). The Analyses of dietary Fibre in Foods. New York, NY, Marcell Dekker. s. 123-158.

Savonen, O., Franco, M., Stefanski, T., Mäntysaari, P., Kuoppala, K. & Rinne, M. 2020. Grass silage pulp as a dietary component for high-yielding dairy cows. *Animal*. doi:10.1017/S1751731119002970.

Sjaunja, L. O., Baevre, L., Junkkarinen, L., Pedersen, J. & Setälä, J. 1990. A Nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. (Proceedings of the 27th session of International Committee of Recording and Productivity of Milk Animal, July 2 – 6 1990, Paris, France). s. 156-157.

Sjöström, E. 1993. Wood chemistry: fundamentals and applications. USA: Academic Press. 293 s.

Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 160: 61-68.

Srivastava, S., Mudgal, V. & Kumar Jain, R. 2012. Lignin - Its role and importance in animal nutrition. *International Journal of Livestock Research* 2: 7-23.

Stefanski, T., Välimaa, A-L., Kuoppala, K. Jalava, T., Paananen, P. & Rinne, M. 2018. In vitro ruminal degradation rate and methane production of different fraction of microcrystalline cellulose (MCC). (Proceedings of the 9th Nordic Feed Science Conference, June 12 – 13 2018, Uppsala, Sweden). s. 87-93.

Stolter, C., Niemelä, P., Ball, J.P., Julkunen-Tiitto, R., Vanhatalo, A., Danell, K., Varvikko, T. & Ganzhorn, J.U. 2009. Comparison of plant secondary metabolites and digestibility of three different boreal coniferous trees. *Basic and Applied Ecology* 10: 19-26.

Takahashi, T., Karita, S., Ogawa, N. & Goto, M. 2005. Crystalline cellulose reduces plasma glucose concentrations and stimulates water absorption by increasing the digesta viscosity in rats. *The Journal of Nutrition* 135: 2405–2410.

Tesfa, A.T., Tuori, M., Syrjälä-Qvist, L. & Kaustell, K. 1992. Effects of partial replacement of barley with rapeseed oil or birch wood in comparison to barley and oats on the performance and blood metabolites of lactating cows. *Agricultural Science in Finland* 1: 255-265.

- Vanhatalo, K.M. & Dahl, O.P. 2014. Effect of mild acid hydrolysis parameters on properties of microcrystalline cellulose. *Bio Resources* 9: 4729-4740.
- Vanhatalo, K.M., Parviainen, K.E. & Dahl, O.P. 2014. Techno-economic analysis of simplified microcrystalline cellulose process. *Bio Resources* 9: 4741-4755.
- Van Keulen, J. & Young, B.A. 1977. Acid insoluble ash as a natural marker for 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 nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2. painos. New York, USA: Cornell university Press. 476 s.
- Wu, W., Xie, J. & Zhang, H. 2016. Dietary fibers influence the intestinal SCFAs and plasma metabolites profiling in growing pigs. *Food Function* 7: 4644-4654.
- Yang, H.J., Cao, Y.C. & Zhang, D.F. 2010. Caecal fermentation patterns in vitro of glucose, cellobiose, microcrystalline cellulose and NDF separated from alfalfa hay in the adult rabbit. *Animal Feed Science and Technology* 162: 149–154.
- Zhou, M., Pu, C., Xia, L., Yu, X., Zhu, B., Cheng, R. & Zhang, J. 2014. Salecan diet increases short chain fatty acids and enriches beneficial microbiota in the mouse cecum. *Carbohydrate Polymers* 102: 772-779.
- Zinn, R.A. 1990. Feeding value of wood sugar concentrate for feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 68: 2598-2602.
- Zinn, R.A. 1993. Comparative feeding value of wood sugar concentrate and cane molasses for feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 71: 2297-2302.