

**RYPSIN JA SPIRULINA PLATENSIS –MIKROLEVÄN VAIKUTUS
LYPSYLEHMIEN MAIDONTUOTANTOON JA MAIDON
RASVAHAPPOKOOSTUMUKSEEN**

Paula Rissanen
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden osasto
Kotieläinten ravitsemustiede
2020

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty		Osasto — Sektion — Department	
Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Maataloustieteiden osasto	
Tekijä — Författare — Author			
Paula Rissanen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title			
Rypsin ja <i>Spirulina platensis</i> -mikrolevän vaikutus lypsylehmien maidontuotantoon ja maidon rasvahappokoostumukseen			
Oppiaine — Läroämne — Subject			
Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji — Arbetets art — Level		Aika — Datum — Month and year	
Maisterintutkielma		Maaliskuu 2020	
		Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages	
		55 s.	
<p>Tiivistelmä – Referent - Abstract</p> <p>Lypsylehmien ruokinnan valkuaisäydennyksen tavoitteena on lisätä kuiva-aineen syöntiä ja parantaa maitotuotosta. Rypsi (<i>Brassica rapa L. oleifera</i>) ja rapsi (<i>Brassica napus L. oleifera</i>) ovat Suomessa yleisesti käytettyjä valkuaisrehuja kotieläinten ruokinnassa, mutta heikko valkuaisomavaraisuus ja muuttuva ilmasto lisäävät tarvetta löytää uusia valkuaislähteitä kotieläinten ruokintaan. Mikrolevät voisivat olla potentiaalinen lypsylehmien valkuaisrehu. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tutkia, vaikuttaako valkuaisäydennys ja rypsin valkuaisen korvaaminen <i>Spirulina platensis</i> –mikrolevän valkuaisella lypsylehmien rehun syöntiin, maitotuotokseen tai maidon rasvahappokoostumukseen.</p> <p>Helsingin yliopiston Viikin opetus- ja tutkimustilan navetassa toteutetussa tutkimuksessa oli 8 ayrshirelehmää, joiden viimeisestä poikimisesta oli kulunut keskimäärin 186 päivää. Tutkimuksen koemalli oli tasapainotettu 4x4 latinalainen neliö 21 päivän koejaksoin. Lehmät jaettiin kahteen neliöön siten, että toisen neliön lehmät olivat pötsifistelöityjä. Kokeessa oli neljä väkirehuruokintaa (12 kg/pv), joista yksi oli negatiivinen kontrolli ilman valkuaislisää. Rypsi-ruokinnassa valkuaisäydennyksenä käytettiin pelkkää rypsiä ja leväruokinnoissa mikrolevän valkuainen korvasi rypsin valkuaisesta joko puolet tai se korvasi rypsi-alkuainetta kokonaan. Valkuaisuusruokinnat olivat isonitrogenisiä. Väki-ruokintaa toteutettiin erillisruokintana ja lehmät saivat vapaasti nurmisäilörehua (D-arvo 656 g/kg kuiva-ainetta).</p> <p>Tutkimuksessa valkuaisäydennys lisäsi suuntaa-antavasti säilörehun syöntiä verrattuna kontrolliruokintaan. Kokonaissyönnissä käsittelyjen välillä ei ollut eroja. Sen sijaan mikrolevän valkuaisen korvauksessa rypsin valkuaisesta väki-ruokintaa syönti väheni. Käsittelyjen välillä ei ollut eroa maidon, EKM- tai rasvatuotoksessa. Energian puute pötsissä saattoi rajoittaa valkuaisäydennyksen maidontuotantovastetta johtuen säilörehun pienestä D-arvosta. Valkuaisuus väheni tilastollisesti suuntaa-antavasti <i>Spirulina</i>-ruokinnassa. Pötsikäymisessä ei ollut merkittävää eroa käsittelyjen välillä. Koska ruokinnat olivat kokonaisuudessaan vähärasvaisia, muutokset maitorasvan rasvahappokoostumuksessa olivat määrällisesti pieniä ja ne heijastivat eroja valkuaisrehujen koostumuksessa. <i>Spirulina</i> sisältävissä ruokinnassa maitorasvan steariinihappopitoisuus väheni lineaarisesti. Steariinihappo on öljyhapon pötsibiohydrogenaation lopputuote. Sen sijaan maitorasvan palmitiinihappo- ja γ-linoleeni- happopitoisuus lisääntyivät lineaarisesti <i>Spirulina</i> korvauksessa rypsin valkuaisesta. <i>Spirulina</i> sisältäkin γ-linoleeni- happoa perinteisiä kotieläinten rehuja enemmän.</p> <p>Tämän tutkimuksen perusteella <i>Spirulina</i> valkuainen voi korvata rypsin valkuaisen osittain tai kokonaan ilman, että lehmän kuiva-aineen kokonaissyönti tai maitotuotos vähenevät erillisruokinnassa. Valkuaisäydennys ei kuitenkaan lisännyt laktaatiokauden keskivaiheessa olevien lypsylehmien kuiva-aineen syöntiä tai maitotuotosta.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords			
Lypsylehmä, valkuaisrehu, rypsi, <i>Spirulina platensis</i> , maidontuotanto			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited			
Maataloustieteiden osasto ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information			
Työtä ohjasivat yliopistotutkija Anni Halmemies-Beauchet-Filleau ja professori Aila Vanhatalo			

HELSINGIN YLIOPISTO — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Author Paula Rissanen			
Työn nimi — Title Effect of rapeseed meal and micro algae <i>Spirulina platensis</i> on milk production and milk fatty acid composition of dairy cows			
Oppiaine — Subject Animal Nutrition			
Työn laji — Level Master's thesis		Aika — Month and year March 2020	Sivumäärä — Number of pages 55 p.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>The aim of supplementary protein feeding of dairy cattle is to increase dry matter intake and milk yield. In Finland, rapeseed (<i>Brassica rapa L. oleifera</i>, <i>Brassica napus L. oleifera</i>) is commonly used protein feed in animal nutrition. However, low self-sufficiency of supplemental protein and a changing climate increase the need to find alternatives for conventional protein feeds. Micro algae might be potential protein feed for dairy cattle. The aim of the study was to evaluate if protein feeding and replacing rapeseed meal by micro algae <i>Spirulina platensis</i> as a protein supplement affect feed intake, milk production and milk fatty acid composition of dairy cows.</p> <p>The study was conducted in the Viikki research farm of the University of Helsinki. Eight multiparous Finnish Ayrshire cows (186 d in milk on average) were used in balanced, replicated 4x4 Latin square with 21-d periods. There were four experimental concentrate feedings (12 kg/d). The control treatment was negative control without a protein supplement. Three other treatments were supplemented isonitrogenously with rapeseed meal, Spirulina or a mixture of rapeseed meal and Spirulina (1:1 on the crude protein basis). Cows were offered 2nd cut grass silage (D-value 656 g/kg dry matter) ad libitum and concentrates were given separately.</p> <p>In the study, protein supplementation tended to increase silage intake compared to control feeding. However, treatment had no effect on total dry matter intake. The substitution of the rapeseed meal by Spirulina decreased concentrate intake and it also tended to decrease milk protein yield. There was no difference in milk, ECM or milk fat yield between the treatments. In milk production, lack of response to protein feeding might be explained by a shortage of energy in the rumen due to low D-value of the silage. Because the diets were low in fat, there were only minor changes in milk fatty acid composition. Changes in milk fatty acid composition reflected the differences in the fatty acid composition of the protein feeds. Substitution of the rapeseed meal by Spirulina decreased stearic acid (end-product of oleic acid ruminal biohydrogenation) but increased palmitic and γ-linolenic acid proportion in milk fat. Spirulina lipid contains γ-linolenic acid more than conventional animal feeds.</p> <p>According to this study, it is possible to replace rapeseed meal by Spirulina partly or completely without a decrease in total dry matter intake or milk yield on separate feeding. However, in this study protein supplementation did not increase dry matter intake or milk yield of dairy cattle in mid-lactation.</p>			
Avainsanat — Keywords Dairy cow, protein supplement, rapeseed meal, <i>Spirulina platensis</i> , milk production			
Säilytyspaikka — Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja — Further information Supervisors: University Researcher Anni Halmemies-Beauchet-Filleau and Professor Aila Vanhatalo			

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	MAIDON RASVAHAPPOKOOSTUMUS JA SIIHEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT.....	9
2.1	Maidon rasvahappokoostumus.....	9
2.2	Ruokinnan vaikutus maidon rasvahappokoostumukseen.....	9
2.3	Muut maidon rasvahappokoostumukseen vaikuttavat tekijät	11
3	RYPSI JA SPIRULINA LYPSYLEHMIEN RUOKINNASSA.....	12
4	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	14
5	AINEISTO JA MENETELMÄT	15
5.1	Koeastelema ja koe-eläimet.....	15
5.2	Rehut ja ruokinta	16
5.2.1	Tutkimusrehut ja koeruokinnat.....	16
5.2.2	Rehujen valmistus ja ruokinta.....	17
5.3	Näytteiden keruu ja analysointi.....	18
5.3.1	Rehu.....	18
5.3.2	Maito.....	18
5.3.3	Pötsineste.....	19
5.3.4	Veri.....	19
5.3.5	Sonta	20
5.4	Näytteiden analyysimenetelmät	20
5.5	Tulosten laskeminen ja tilastollinen käsittely	22
6	TULOKSET	23
6.1	Koerehujen koostumus.....	23
6.2	Koerehujen syönti, sulavuus ja rasvahappojen saanti	25
6.3	Maitotuotos ja maidon koostumus.....	28
6.4	Maidon rasvahappokoostumus.....	28
6.5	Pötsikäyminen, plasman energiametaboliitit ja mitorauhasen ravintoaineiden otto	29
7	TULOSTEN TARKASTELU	32

7.1	Koerehujen koostumus.....	32
7.2	Koerehujen syönti, sulavuus ja rasvahappojen saanti	33
7.3	Maitotuotos ja maidon koostumus.....	35
7.4	Maidon rasvahappokoostumus.....	37
7.5	Pötsikäyminen, plasman energiametaboliitit ja maitorauhasen ravintoaineiden otto	40
8	JOHTOPÄÄTÖKSET	42
	KIITOKSET.....	44
	LÄHTEET	45

1 JOHDANTO

Valkuainen on rehujen kallein komponentti ja Suomi on muiden EU-maiden tavoin riippuvainen valkuaisrehujen tuonnista. Eurooppaan tuodaan eniten valkuaisrehuksi soijapapua (*Glycine max*), jota käytetään etenkin yksimahaisten valkuais täydennysrehuna. Märehtijöiden ruokinnassa Suomessa käytetään valkuaisrehuna pääasiassa rypsiä (*Brassica rapa L. oleifera*) ja rapsia (*Brassica napus L. oleifera*). Omavaraisuus täydennysvalkuaisen osalta on Suomessa vain 15 % (Kaukovirta-Norja ym. 2015). Ilmaston lämpeneminen vaikuttaa ruuantuotantoon myös Suomessa. Se voi mahdollistaa Suomessa uusien kasvien viljelyn kotieläinten rehuksi. Toisaalta ilmaston muuttuessa nykyiset viljelykasvit eivät välttämättä enää menesty maassamme yhtä hyvin kuin aiemmin. Heikko valkuaisomavaraisuus ja muuttuva ilmasto lisäävätkin tarvetta uusien valkuaislähteiden löytämiseksi kotieläinten ruokintaan. Maailmanlaajuisesti kasvava väestö ja eläinperäisten tuotteiden lisääntyvä kulutus lisäävät painetta uusien valkuaislähteiden käyttöön.

Lypsylehmien geneettisen edistymisen myötä niiden tuotantopotentiaali on lisääntynyt, joten myös niiden ravintoaineiden tarve on aiempaa suurempi. Ruokinnan valkuais täydennyksen tavoitteena on ravintoaineiden tarpeen täyttymisen lisäksi hyödyntää mahdollisimman suuri osa lehmän tuotantopotentiaalista. Lisäksi tuotannon taloudellisen kannattavuuden vuoksi optimaalinen valkuaisruokinta on tärkeää. Valkuais täydennyksen onkin havaittu useissa tutkimuksissa lisäävän maitotuotosta (Roffler ja Thackler 1983, Heikkilä ym. 1998, Kokkonen ym. 2000, Wu ja Zatter 2000, Mäntysaari ym. 2004). Joissakin tutkimuksissa valkuais täydennys on lisännyt myös rasva- ja valkuais tuotosta (Heikkilä ym. 1998, Kokkonen ym. 2000, Mäntysaari ym. 2004). Kaikissa tutkimuksissa valkuais täydennys ei kuitenkaan ole lisännyt maitotuotosta (Christensen ym. 1993, Kalscheur ym. 1999).

Vaikka nestemäisten maitotuotteiden kulutus on vähentynyt koko 2010-luvun ajan, kulutettiin maitoa Suomessa vuonna 2018 noin 125 kg/henkilö (Luonnonvarakeskus 2019). Juustojen kulutus on sen sijaan lisääntynyt 2010-luvulla selvästi. Vielä 2010 juustoa kulutettiin Suomessa 19 kilogrammaa henkilöä kohden, kun taas vuonna 2018

kulutus oli lähes 26 kilogrammaa henkilöä kohden (Luonnonvarakeskus 2019). Runsaasti tyydyttyneitä rasvoja sisältävien maitotuotteiden, kuten esimerkiksi voin, on havaittu lisäävän sydän- ja verisuonitautien riskiä (Calabrese ja Riccardi, 2019). Toisaalta joissakin meta-analyyseissa maitotuotteiden kokonaiskulutuksen ei kuitenkaan ole havaittu vaikuttavan riskiin sairastua sydän- ja verisuonitauteihin (Alexander ym. 2016, Drouin-Chartier ym. 2016). Yhtenä sydän- ja verisuonitautien riskitekijänä on pidetty tyydyttyneiden rasvahappojen runsasta saantia (Calabrese ja Riccardi, 2019). Teollisuusmaissa maitotuotteet ovatkin lauriinihapon (12:0) ja myristiinihapon (14:0) pääasialliset lähteet ja lisäksi suuri osa ravinnosta saatavasta palmitiinihapon (16:0) saadaan maitotuotteista (Givens ja Shingfield 2006). Edellä mainittujen rasvahappojen runsaan saannin on havaittu olevan yhteydessä veren kolesterolipitoisuuden lisääntymiseen (Mensink ym. 2003, Noto ym. 2016). Lisäksi maitotuotteet ovat *trans*-rasvahappojen pääasiallinen lähde ihmisravitsemuksessa. Vaikka *trans*-rasvahappojen on osoitettu vaikuttavan terveyteen epäedullisesti, on maidon sisältämän *trans*-rasvoihin kuuluvan konjugoidun linolihapon (CLA) havaittu vaikuttavan positiivisesti terveyteen (Lock ja Bauman 2004). Koska lypsylehmien ruokinnalla voidaan vaikuttaa maidon rasvahappokoostumukseen monin eri tavoin, on maidon rasvahappokoostumusta mahdollista muuttaa ihmisravitsemuksen kannalta aiempaa terveellisemmäksi (Chilliard ym. 2007, Glasser ym. 2008).

Maidon rasvahappokoostumus vaikuttaa myös maidon ominaisuuksiin elintarvikkeena. Maidon Cl8:2 n-6 ja Cl8:3 n-3 -rasvahappojen pitoisuuden lisäämisen tiedetään lisäävän maidon alttiutta hapettua ja täten aiheuttavan makuhaittoja maitotuotteisiin (Palmqvist 2005). Lisäksi monityydyttyneiden rasvahappojen pitoisuuden lisääminen maitorasvassa tekee voista ja juustosta tavallista pehmeämpiä. Maidon koostumus vaikuttaa myös tuottajan maidosta saamaan hintaan. Vuoden 2019 alusta Suomen suurin maidonjalostaja Valio muutti maidon hinnoitteluperusteitaan painottaen aiempaa enemmän maidon rasvapitoisuutta. Koska runsaasti kasvi-, levä- tai kalaöljyjä tai paljon väkirehua sisältävät ruokinnat voivat aiheuttaa maitorasvan depressiota (Shingfield ym. 2010), on tilan taloudellisen tuottavuuden kannalta tärkeää, ettei käytetty valkuaisrehu vähennä maidon pitoisuuksia.

2 MAIDON RASVAHAPPOKOOSTUMUS JA SIIHEN VAIKUTTAVAT TEKIJÄT

2.1 Maidon rasvahappokoostumus

Maitorasva sisältää luonnostaan jopa yli 400 erilaista rasvahappoa (Patton ja Jensen 1975). Suurin osa (97-98 %) maidon lipideistä on triglyseridejä, jossa glyseroliin on esteröitynyt kolme rasvahappoa (Jensen 2002). Maidossa on myös vapaita rasvahappoja, mutta niiden osuus maidon lipideistä on erittäin pieni (Jensen 2002). Suurin osa maitorasvan rasvahapoista on tyydyttyneitä rasvahappoja (MacGibbon ja Taylor 2006). Määrällisesti eniten on palmitiinihappoa (16:0), jota maidossa on noin 30 % maidon rasvahapoista (Lindmark-Månsson 2008). Tyydyttyneistä rasvahapoista steariinihappoa (18:0) on noin 12 % ja myristiinihappoa (14:0) noin 11 % maidon rasvahapoista (Lindmark-Månsson 2008). Vaikka suurin osa maidon rasvahapoista on tyydyttyneitä rasvahappoja, yksittäisistä rasvahapoista toiseksi yleisin maidon rasvahappo on öljyhappo (*cis*-9 18:1), jota maidon rasvahapoista on noin 20 %. Osa maidon tyydyttymättömistä rasvahapoista on *trans*-rasvahappoja, joista yleisimmät ovat vakseenihappo (*trans*-11 18:1) ja rumeenihappo (*cis*-9,*trans*-11 konjugoitu linolihappo CLA).

2.2 Ruokinnan vaikutus maidon rasvahappokoostumukseen

Maitorasvan rasvahapot ovat peräisin joko rehuista, rasvakudoksesta, maitorauhasen de novo –synteesistä tai ne ovat pötsimikrobien tuottamia (Grummer 1991, Shingfield ym. 2010). De novo –synteesin lähtöaineita ovat asetaatti ja β -hydroksibutyraatti, jotka ovat pötsin mikrobisulatuksen lopputuotteita (Grummer 1991). β -hydroksibutyraattia muodostuu, kun pötsissä syntyvä butyraatti imeytyy pötsin epiteelin läpi verenkiertoon.

Tyypillisesti märehitjää saa rehuista lipidejä 20 – 40 g/kg ka ja rehut sisältävät yleensä runsaasti tyydyttymättömiä rasvahappoja (Shingfield ym. 2010). Vaikka rehussa olisi paljon tyydyttymättömiä rasvahappoja, on märehitjoiden lihassa ja maidossa enemmän tyydyttyneitä rasvahappoja kuin tyydyttymättömiä (Shingfield ym. 2010). Tämä johtuu

siitä, että rehun vapaiden rasvahappojen kaksoissidoksiin lisätään pötsissä vetyä, jolloin tyydyttymättömät rasvahapot pelkistyvät eli biohydrogenoituvat. Linolihapon ja alfa-linoleenihapon kaksoissidoksen isomerisaatiossa syntyy väli tuotteina erilaisia konjugoituneita rasvahappoja sekä *trans*-rasvahappoja, jotka lopulta pelkistyvät steariinihapoksi (Shingfield ym. 2010). Ruokinnasta riippuen 70–95 % linolihaposta ja 85–100 % alfa-linoleenihaposta biohydrogenoituvat pötsissä (Doreau ja Ferlay 1994). Tämän perusteella steariinihappo on yleisin pötsistä poistuva rasvahappo.

Vaikka tyydyttymättömien rasvahappojen biohydrogenaatio pötsissä on runsasta, lisää niiden saanti maitorasvan tyydyttymättömien rasvahappojen pitoisuutta. Muutokset maitorasvan monitydyttymättömien rasvahappojen kokonaismäärässä ovat verrattain pieniä etenkin pitkäketjuisten monitydyttymättömien rasvahappojen osalta, vaikka ruokintaan lisättäisiin runsaasti monitydyttymättömiä rasvahappoja sisältävää mikroleevää tai kasvi- tai kalaöljyjä (Givens ja Shingfield 2006). Maitorasvan monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus voi huomattavasti lisääntyä runsaasti kasvi- tai kalaöljyjä sisältävissä ruokinnoissa, mutta mikäli rasvatuotos vähenee, ei rasvahappojen absoluuttinen erityys lisääny yhtä paljon. Esimerkiksi Kaireniuksen ym. (2015) tutkimuksessa maitorasvan monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus lähes kolminkertaistui ruokinnan sisältäessä 300 grammaa kalaöljyä vuorokaudessa. Samaan aikaan rasvatuotos kuitenkin väheni lähes puoleen.

Rehujen rasvahappokoostumuksen lisäksi maitorasvan koostumukseen vaikuttavat myös karkearehun ja väkirehun suhde sekä karkearehun tyyppi (Palmquist ym. 1993, Halmemies-Beauchet-Filleau 2013). Ruokinnan korkean tärkkelyspitoisuuden tiedetään vähentävän maidon rasvapitoisuutta, jolloin myös maitorasvan rasvahappokoostumus muuttuu. Ruokinnan väkirehun osuuden lisääntyessä lyhytketjuisten rasvahappojen pitoisuus maitorasvassa vähenee, kun taas 18-hiilisten rasvahappojen pitoisuus lisääntyy (Palmquist ym. 1993). Lisäksi väkirehulähde vaikuttaa maitorasvan rasvahappokoostumukseen.

2.3 Muut maidon rasvahappokoostumukseen vaikuttavat tekijät

Ruokinnan lisäksi maidon rasvahappokoostumukseen vaikuttavat rotu, eläimen perimä ja tuotoskauden vaihe (Palmqvist ym. 1993). Yleisesti ottaen niiden rotujen, joiden maidon rasvapitoisuus on suuri, myös maitorasvan tyydyttyneiden ja de novo -rasvahappojen pitoisuus on suuri. Larsenin ym. (2012) tutkimuksessa havaittiin, että tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuus maitorasvassa oli suurempi jerseyillä kuin holsteinilla. Tulokset olivat yhteneväiset myös Palladinon ym. (2010) tutkimuksen kanssa. Lisäksi brown swiss –rotuisten lehmien tuottaman maidon maitorasvan tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuuden on havaittu olevan suurempi verrattuna holsteiniin (Bulut ym. 2015). Melen ym. (2016) tutkimuksessa puolestaan havaittiin, että ensikoiden maitorasva sisälsi vähemmän de novo -rasvahappoja kuin kahdesti tai useammin poikineiden.

Tuotoskauden alussa C6 – C14 rasvahappojen osuus on maitorasvassa pienempi kuin tuotoskauden keski- ja loppuvaiheessa (Palmquist ym. 1993, Kay ym. 2005). Sen sijaan pitkäketjuisten (>C16) rasvahappojen osuus on tuotoskauden alussa suurempi ja niiden osuus pienenee tuotoskauden edetessä (Palmquist ym. 1993, Garnsworthy ym. 2009, Stoop ym. 2009). Tuotoskauden alussa lehmät ovat negatiivisessa energiataseessa ja ne mobilisoivat kudosasvojaan, jolloin veren vapaiden rasvahappojen (NEFA) pitoisuus lisääntyy ja rasvakudoksesta lähtöisin olevia pitkäketjuisia rasvahappoja kulkeutuu maitorauhaseen, mikä näkyy niiden pitoisuuden lisääntymisenä maitorasvassa (Belyea ja Adams 1990, Palmquist ym. 1993). Lisääntynyt pitkäketjuisten rasvahappojen otto maitorauhasessa vähentää maitorasvan de novo –synteesiä, jolloin lyhytketjuisten rasvahappojen pitoisuus maitorasvassa vähenee (Enjabert ym. 1998, Halmemies-Beauchet-Filleau ym. 2013). Eastridgen ja Palmquistin (1988) (ref. Palmquist ym. 1993) tutkimus osoitti, että maidon rasvahappokoostumus on selvästi erilainen ensimmäiset kahdeksan viikkoa poikimisesta verrattuna maidon rasvahappokoostumukseen laktaatiokauden 16 viikolla. Tutkimuksessa laktaatiokauden viikolla 12 rasvahappokoostumus oli lähestulkoon vastaava kuin viikolla 16.

3 RYPSI JA SPIRULINA LYPSYLEHMIEN RUOKINNASSA

Rypsi ja rapsi ovat käytetyimmät lypsylehmien valkuaisrehut Suomessa, kun taas muualla maailmassa soija on yleinen. Rypsin ja rapsin tuotosvasteen on havaittu olevan soijaa parempi nurmisäilörehuvaltaisessa ruokinnassa, joten ne soveltuvat erinomaisesti lypsylehmien valkuaisrehuksi Suomen olosuhteissa (Huhtanen ym. 2011). Rypsin vaikutusta maidon rasvahappokoostumukseen on tutkittu useissa tutkimuksissa (Emanuelson ym. 1993, Hristov ym. 2011, Kliem ym. 2011, Lerch ym. 2012). Lerchin ym. (2012) tutkimuksessa havaittiin, että muutokset maitorasvan rasvahappokoostumuksessa ovat saman suuntaisia, mutta suurempia käytettäessä kylmäpuristettua rypsirouhetta kuin uuttokäsiteltyä rypsirouhetta tai kokonaisia rypsin siemeniä. Rypsi sisältää tyypillisesti runsaasti öljyhappoa (*cis*-9 18:1) (taulukko 1) ja rypsin lisääminen ruokintaan lisääkin maitorasvan tyydyttymättömien rasvahappojen pitoisuutta. Verrattuna *Spirulina platensis* -mikrolevään (tästä lähtien *Spirulina*) rypsi sisältää tyypillisesti vähemmän monitydyttymättömiä rasvahappoja (taulukko 1).

Taulukko 1. *Spirulina* ja rypsiöljyn rasvahappokoostumus

g/100 g rasvahappoja	Spirulina		Rypsi	
	Ötles ja Pire 2001	Lamminen ym. 2019a	Zambiasi ym. 2007	Okhrouhla ym. 2018
16:0	42,3	45,6	9,85	5,59
<i>cis</i> -9 16:1	1,00	2,80	-	0,24
18:0	0,95	1,05	1,87	1,7
<i>cis</i> -9 18:1	1,97	2,73	62,4	54,5
18:2n-6	16,2	23,4	20,1	23,8
18:3n-3	-	0,42	8,37	11,3
18:3n-6	20,1	19,9	-	-
Tyydyttyneet rasvahapot	51,6	47,7	6,98	8,51
Kertatyydyttymättömät rasvahapot	5,88	8,11	64,4	56,3
Monitydyttymättömät rasvahapot	39,5	44,2	28,6	35,1

Spirulina on yhteyttävä syanobakteeri, jota kasvaa luonnonvaraisena Afrikassa, Aasiassa ja Etelä-Amerikassa (Heuze ym. 2017). Kaupalliseen käyttöön mikroleviä on kasvatettu perinteisesti avoimissa kasvatusaltaissa. Kasvatusaltaita voidaan perustaa esimerkiksi

maille, jotka eivät sovellu maanviljelyyn tai vesistöjen rannoille, jolloin ne eivät kilpaile viljelymaasta muiden kasvien kanssa (Heuze ym. 2017). Mikroleviä voidaan kasvattaa myös suljetussa systeemissä, kuten fotobioreaktoreissa, jolloin kontaminaatoriskit ovat pienempiä kuin avoimissa kasvatusaltaissa (Heuze ym. 2017). Suljettujen sistemien etu on myös se, että kasvatusolosuhteita, kuten lämpötilaa ja valoa, voidaan tarkasti säädellä (Ravishankar ym. 2012).

Spirulinan rehukäyttöä on tutkittu aiemmin etenkin kalojen ja siipikarjan ruokinnassa, mutta sen ja muiden mikrolevien soveltuvuutta myös lypsylehmien ruokintaan on tutkittu viime vuosina (Belay ym. 1996, Lamminen 2019). Kun Spirulina tai muut mikrolevät ovat korvanneet lypsylehmien perinteisiä valkuaisrehuja, maitotuotosvaste on riippunut perusdieetin valkuaislähteestä (Lamminen 2019). Mikrolevän korvatessa osittain rypsin valkuaisista maitotuotos on vähentynyt, kun taas levän korvatessa härkävavun tai soijan valkuaisista, maitotuotos on sen sijaan havaittu lisääntyneen (Lamminen ym. 2019ab).

Mikrolevien vaikutusta maidon rasvahappokoostumukseen on tutkittu jonkin verran. Usein näissä tutkimuksissa on käytetty mikrolevävalmisteita, jotka ovat sisältäneet runsaasti pitkäketjuisia, monityydyttymättömiä rasvahappoja, etenkin dokosaheksaenihappoa (DHA) (Boackert ym. 2007, AbuGhazaleh ym. 2009, Vanbergue ym. 2018). Lammisen ym. (2019b) tutkimuksessa ja Ylisen (2015) maisterintutkielmassa raportoitiin muutoksia maidon rasvahappokoostumuksessa, kun mikrolevien valkuaisella korvattiin rypsin tai soijan valkuaisista. Molemmissa tutkimuksissa oli saatu tilastollisesti merkitseviä muutoksia maidon rasvahappokoostumuksessa, mutta muutokset olivat selvästi pienempiä kuin esimerkiksi Boeckartin ym. (2008) tutkimuksessa, jossa käytettiin DHA-rikastettua mikrolevävalmistetta. Spirulinan vaikutus maitorasvan rasvahappokoostumukseen eri tutkimusten välillä on vaihdellut. Christakin ym. (2011) ja Pótin ym. (2015) tutkimuksissa Spirulina lisäsi kertatydyttymättömien rasvahappojen pitoisuutta maidossa. Monityydyttymättömien rasvahappojen pitoisuuteen Spirulina ei Pótin ym. (2015) tutkimuksessa vaikuttanut, kun taas Christakin ym. (2011) tutkimuksessa Spirulina lisäsi monityydyttymättömien rasvahappojen pitoisuutta, kun poikimisesta oli kulunut 45 päivää. Rypsiin verrattuna Spirulinan lipidit sisältävät runsaasti palmitiinihappoa (16:0), minkä vuoksi tyydyttyneiden rasvahappojen kokonaisuus Spirulinassa on suuri (taulukko 1). Monityydyttymättömistä rasvahapoista

Spirulinassa on runsaasti γ -linoleenihappoa (18:3 n-6), jota rypsi ei sisällä lainkaan (taulukko 1).

Suomessa mikrolevien kasvatuksesta on toistaiseksi melko vähän kokemusta. Mikrolevien kasvatusta biopolttoainetuotantoon sikalan jätevedessä on tutkittu Vaasan yliopistossa ja Itä-Suomen yliopistossa on tehty tutkimusta mikrolevien käytöstä teollisuuden jätevesien puhdistuksessa (Vaasan yliopisto 2016, Mustonen ja Vuorre 2019). Suomessa toimii myös yksi kaupallinen yritys, joka kasvattaa mikroleviä hyödyntäen teollisuuden nestemäisiä sivuvirtoja ja poistovesiä (Karmitsa 2018). Yritys jalostaa mikrolevistä erilaisia komponentteja esimerkiksi kosmetiikkateollisuuden käyttöön.

4 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimus oli osa Euroopan aluekehitysrahaston ja Raisioagro Oy:n rahoittamaa Algae Foods – *Levän uudentyypinen hyödyntäminen* –projektia. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tutkia, vaikuttaako valkuaisäydennys ja rypsin valkuaisen korvaaminen *Spirulina platensis* –mikrolevän valkuaisella lypsylehmien rehun syöntiin, maitotuotukseen tai maidon koostumukseen, mukaan lukien maidon rasvahappokoostumus. Ensimmäinen hypoteesi oli, että valkuaisäydennys lisää rehun syöntiä ja maitotuotosta. Toinen hypoteesi oli, että rypsin valkuaista voidaan korvata mikrolevän valkuaisella ilman, että se vaikuttaa negatiivisesti maitotuotukseen tai maidon rasva- ja valkuaispitoisuuteen tai maitorasvan rasvahappokoostumukseen.

5 AINEISTO JA MENETELMÄT

5.1 Koeastelema ja koe-eläimet

Tutkimus toteutettiin Viikin opetus- ja tutkimustilan navetan parsiosastossa 3.5. – 25.7.2014. Kokeessa oli 8 ayrshirerotuista lypsylehmää, joista 4 oli pötsifistelöityjä. Lehmät olivat poikineet 2 – 7 kertaa ja kokeen alkaessa viimeisimmästä poikimisesta oli kulunut keskimäärin $186 \pm 22,6$ (keskihajonta) päivää. Kokeen alkaessa lehmät lypsivät keskimäärin $35,8 \pm 3,08$ (keskihajonta) kg päivässä. Lehmät punnittiin (CV 9600 Scale, Solotop Oy, Helsinki, Suomi) kahtena peräkkäisenä päivänä kokeen alussa ja lopussa. Lehmien elopaino kokeen alussa oli keskimäärin $718 \pm 54,4$ kg (keskihajonta) ja kokeen lopussa $746 \pm 61,7$ kg.

Kokeessa tutkittavana tekijänä oli *Spirulina platensis* –mikroleväjauho (Duplaco B. V., Hengelo Alankomaat), jonka valkuainen korvasi väkirehun rypsin valkuaista osittain tai kokonaan. Tutkimuksen koemalli oli kaksinkertainen 4 x 4 latinalainen neliö. Lehmät jaettiin kahteen neliöön siten, että fistelöidyt lehmät olivat neliössä 1 (taulukko 2). Koemalli sisälsi kaksi tasapainotettua neliötä, neljä jaksoa ja neljä ruokintaa (taulukko 3). Kunkin jakson pituus oli 21 päivää, joista päivät 1 – 14 olivat totutuskausia ja päivinä 15 – 21 oli keruukausi. Tulokset laskettiin keruuviikon tietojen perusteella.

Taulukko 2. Kokeessa mukana olleet lehmät

Neliö 1 (fistelöidyt lehmät)				Neliö 2			
Numero	Nimi	Poikima- kerta	Poikima- päivä	Numero	Nimi	Poikima- kerta	Poikima- päivä
1	Amissa	3	9.10.2013	5	Yassoo	5	11.10.2013
2	Avenue	4	8.11.2013	6	Vassokuu	6	12.10.2013
3	Ahaa	4	4.11.2013	7	Helium	2	4.10.2013
4	Ässämix	5	11.12.2013	8	Encell	2	21.10.2013

Taulukko 3. Lehmien väkirehuruokinnat jaksoittain

Jakso	Aika	Neliö 1 (fistelöidyt lehmät)				Neliö 2			
		Lehmän nro				Lehmän nro			
		1	2	3	4	5	6	7	8
I	3.5. - 23.5.	K	R	RS	S	K	R	RS	S
II	24.5. - 13.6.	R	RS	S	K	S	K	R	RS
III	14.6. - 4.7.	S	K	R	RS	R	RS	S	K
IV	5.7. - 25.7.	RS	S	K	R	RS	S	K	R

K=Valkuaislisätön kontrolli, R=valkuaislisänä rypsi, RS=valkuaislisänä rypsin ja Spirulina-levän seos, S=valkuaislisänä Spirulina-levä

5.2 Rehut ja ruokinta

5.2.1 Tutkimusrehut ja koeruokinnat

Kokeessa oli neljä erilaista väkirehuruokintaa, joista yksi oli negatiivinen kontrolli ilman valkuaislisää. Kontrolliruokinnassa lehmät saivat väkirehuna vilja-leikeseosta, joka sisälsi ohraa, ohrarehua, kauraa, melassileikettä ja seosmelassia (Viljaleikeseos, A-Rehu Oy, Seinäjoki, Suomi) 11,7 kg/pv. Rypsiaruokinnassa lehmät saivat vilja-leikeseosta ja rypsiaruokintaa (Rypsiaruokinta, A-Rehu Oy). Rypsiaruokinta sisälsi 767 g/kg rypsirohetta ja 75 g/kg rapsipuristetta. Leväruokinnassa rypsiaruokinnan valkuainen korvattiin puoliksi tai kokonaan Spirulinan valkuaisella siten, että raakavalkeaisen saanti valkuaislisästä oli vakio.

Jotta päivittäinen seosmelassin ja melassileikkeen saanti väkirehuista pysyi vakiona, lisättiin leväruokintoihin vilja-leikeseoksen ja rypsiaruokinnan sisältämän melassileikkeen ja seosmelassin määrää vastaava määrä kyseisiä rehuja (Farmarin raeleike ja Farmarin seosmelassi, Suomen Rehu, Hankkija Oy, Hyvinkää, Suomi). Täten seosmelassin ja melassileikkeen saanti väkirehuista kaikissa koeruokinnassa oli lähes sama. Vilja-leikeseoksen määrää muutettiin niin, että väkirehun kokonaismäärä päivässä oli 12 kg kaikissa ruokinoissa. Lisäksi lehmät saivat 300 g/pv kivennäisseosta (Pihatto-Melli Plus, Raisioagro Oy, Raisio, Suomi). Taulukossa 4 on esitetty ruokintojen väkirehulisältö.

Taulukko 4. Koeruokintojen väkirehusingä

Väkirehu, kg ka/vrk	Käsittely			
	K	R	RS	Spirulina
Viljaleike	10,52	7,87	8,52	9,17
Melassileike			0,09	0,18
Melassi			0,03	0,06
Rypsitiiviste		2,55	1,28	
Spirulina			0,57	1,13
Kivennäinen	0,30	0,30	0,30	0,30
Yhteensä	10,82	10,72	10,79	10,85

K=Valkuaislisätön kontrolli, R=valkuaislisänä rypsitiiviste, RS=valkuaislisänä rypsitiivisten ja Spirulina-levän seos, S=valkuaislisänä Spirulina-levä

Ruokinnassa käytetty nurmisäilörehu oli pyöröpaaleihin (Welger Profi RP-235, Welger Maschinenfabrik GmbH, Wolfenbüttel, Saksa) korjattua toisen sadon timotei-nurminatasäilörehua, jonka säilöntään oli käytetty muurahaishappoa (AIV 2+, Kemira Oy, Helsinki, Suomi). Säilöntäaineen annostus oli kuusi litraa säilöntäainetta tuhatta rehukiloa kohden. Rehu oli korjattu 2.8.2014 Viikin opetus- ja tutkimustilan pellolta.

5.2.2 Rehujen valmistus ja ruokinta

Ruokinta toteutettiin erillisruokintana. Väkirehua annettiin viisi kertaa päivässä (kello 6.00, 10.30, 14.30, 17.00 ja 19.30) rehukaukaloön ripustettavista erillisistä väkirehukupeista. Rehut valmistettiin siten, että leväjauho, seosmelassi ja kivennäinen sekoitettiin ensin veteen, minkä jälkeen leväseos sekoitettiin muihin komponentteihin. Levän annostusta lisättiin vähitellen jokaisen jakson alussa viikon ajan.

Kokeessa eläimet saivat säilörehua vapaasti (tähteeksi jäi vähintään 5 % annetusta säilörehun määrästä). Säilörehu jaettiin käsin kolme kertaa vuorokaudessa (kello 9.00, 13.30 ja 18.00). Rehukaukalot tyhjennettiin päivittäin kello 8 – 9. Rehumäärä kirjattiin aina ennen rehun jakoa sekä rehunjaon jälkeen ja rehunkulutus laskettiin vähentämällä jäännös jaetusta rehumäärästä. Säilörehut silputtiin seosrehumikserissä (CutMix, Pellon

Group, Ylihärmä, Suomi) kolme kertaa viikossa ja rehukärryihin otettu säilörehu säilytettiin kylmiössä.

5.3 Näytteiden keruu ja analysointi

5.3.1 Rehu

Keruuviikon aikana säilörehusta kerättiin jokaisella jakokerralla kilon näyte, joka pakastettiin (-20 °C). Rasvahappoanalyysiä varten otettu erillinen säilörehunäyte kylmäkuivattiin ja säilytettiin -80 °C:ssa. Kaikista väkirehun komponenteista kerättiin keruuviikolla päivittäin näytteet. Mikäli eläimet jättivät väkirehua syömättä, kerättiin tähteestä näyte jokaisen jakson viimeisen viikon aikana. Kunkin jakson näytteet esikäsiteltiin ja analysoitiin erikseen lukuun ottamatta kivennäisseosta ja melassileikettä sekä seosmelassia.

Kuivatuista ja jauhetuista rehunäytteistä analysoitiin primäärinen ja sekundäärinen kuiva-aine, tuhka, raakavalkuainen, neutraalidetergenttikuitu (NDF), happoon liukenematon tuhka (AIA) ja pitkäketjuiset rasvahapot. Lisäksi säilörehuista tehtiin *in vitro* –sellulaasisulavuus ja erikoisanalyysi, jossa määritettiin maitohappo, haihtuvat rasvahapot, pelkistävät sokerit, ammoniumtyyppi ja etanoli. Väkirehusta määritettiin myös kokonaisrasva.

Melassileikkeestä ja seosmelassista tehtiin kustakin yhdistetty analyysinäyte kahdelta ensimmäiseltä ja kahdelta viimeiseltä jaksolta. Melassileikkeestä tehtiin samat analyysit kuin muistakin väkirehuista. Seosmelassista määritettiin primäärinen ja sekundäärinen kuiva-aine, tuhka, raakavalkuainen ja AIA. Kivennäisseoksesta tehtiin koko kokeen ajalta yhdistetty analyysinäyte, josta määritettiin primäärinen kuiva-aine, tuhka ja AIA.

5.3.2 Maito

Lehmät lypsettiin kahdesti päivässä kello 6 ja kello 17 putkilypsykoneella (DelPro, DeLaval, Tumba, Ruotsi). Maitomäärä mitattiin joka päivä jokaisesta lypsykerrasta (Tru-

Test, Auckland, Uusi-Seelanti) ja kirjattiin ylös 100 ml tarkkuudella. Maitonäytteet otettiin keruuviikolla neljänä peräkkäisenä lypsykertana (koepäivät 18 – 20). Maidosta analysoitiin rasva, valkuainen ja laktoosi Valion Seinäjoen laboratoriossa. Näiden peruskoostumusnäytteiden säilömiseen käytettiin Bronopol-säilöntäainepilleriä. Maidosta analysoitiin myös rasvahapot, jotka määritettiin pakastetusta (-20 °C) suhteellisesta näytteestä.

5.3.3 Pötsineste

Pötsinestenäytteet otettiin jokaisen koejakson 20. päivänä fistelilehmiltä ennen aamuruokintaa (06.00) ja sen jälkeen 90 minuutin välein kello 16.30 asti (7.30, 9.00, 10.30, 12.00, 13.30, 15.00 ja 16.30). Pötsineste suodatettiin yksinkertaisen harsokankaan läpi ja suodoksesta mitattiin välittömästi pH (S20 SevenEasy™ pH, Mettler-Toledo Ltd, Leicester, Iso-Britannia).

Pötsinesteestä määritettiin haihtuvat rasvahapot, ammoniumtyppi sekä laskettiin alkueläimet. Alkueläinten laskemiseksi suodoksesta otettiin 10 ml:n osanäyte, johon lisättiin 30 ml 10 % (v/v) formaldehydiä laimennettuna fysiologiseen 0,9 % (W/v) suolaliuokseen. Alkueläinnäyte kerättiin päivän aikana lehmäkohtaisesti samaan pulloon ja näytettä säilytettiin jääkaapissa. Haihtuvien rasvahappojen määrittämiseksi 25 ml näytepulloon pipetoitiin 0,5 ml kyllästettyä elohopeakloridia, 5 ml pötsinestettä ja 2 ml 1M natriumhydroksidia. Tämän jälkeen näyte pakastettiin (-20 °C) välittömästi. Eri näytteenottoaikoina otetuista näytteistä määritettiin etikka-, propioni-, voi-, isovoi-, kaproni-, valeriaana- ja isovaleriaanahapot.

5.3.4 Veri

Verinäytteitä otettiin kaikilta lehmillä häntäsuonesta ja fistelilehmiltä lisäksi maitosuonesta koejakson 21. päivänä kolme kertaa päivässä (kello 5.30, 8.30 ja 11.30). Näytettä otettiin kolme vakuumpiputkellista (3 x 10 ml) kullakin kerralla kustakin näytesuonesta. Näyteputket säilytettiin jäissä näytteiden jatkokäsittelyyn saakka. Verinäytteet sentrifugoitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia 2220 rpm (Centrifuge D15, B. Braun Biotech International, Melsungen, Saksa). Näytteenottoaikojen yli yhdistetyistä

plasmanäytteistä määritettiin insuliini, etikkahappo ja aminohapot. Maitosuonesta otetuista näytteistä ei määritetty insuliinia. Glukoosi, vapaat rasvahapot ja β -hydroksibutyraatti määritettiin jokaisesta näytteestä erikseen.

5.3.5 Sonta

Sontanäytteet kerättiin kaikilta lehmillä keruuviikon neljänä peräkkäisenä päivänä (koejakson päivät 17. – 20.) aamulla (kello 7.00) ja iltapäivällä (kello 15.30). Näytettä otettiin noin puoli litraa suoraan peräsuolesta ja ne säilytettiin koko jakson ajan pakastimessa. Keruujakson päätyttyä näytteet sulatettiin, sekoitettiin, kuivattiin ja jauhettiin, minkä jälkeen niistä analysoitiin kuiva-aine, tuhka, NDF ja AIA.

5.4 Näytteiden analyysimenetelmät

Kerätyt rehu-, pötsineste-, veri-, sonta- ja virtsanäytteet analysoitiin Helsingin yliopiston Maataloustieteen laitoksen Kotieläintieteen laboratoriossa. Analyysinäytteitä rehuista ja sonnasta pidettiin tuulettavassa kuivauskaapissa (Memmert, Memmert GmbH, Schwabach, Saksa) 103 °C:ssa tunnin ajan, minkä jälkeen rehunäytteet olivat 50 °C:ssa ja sontanäytteet 70 °C:ssa kahden vuorokauden ajan. Kuivatut analyysinäytteet rehusta jauhettiin vasaramyllyllä (sakomylly KT-3100, Koneteollisuus Oy, Helsinki, Suomi) 1 millimetrin seulalla ja sonnasta 1,5 millimetrin seulalla. Pitkäketjuisten rasvahappojen määrittämistä varten rehunäytteet kylmäkuivattiin (Christ, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Saksa), jauhettiin 1 millimetrin seulalla (sakomylly KT-3100, Koneteollisuus Oy) ja säilytettiin -80°C:ssa.

Rehu- ja sontanäytteiden primäärinen kuiva-aine määritettiin kuivaamalla näytteitä lämpökaapissa 103 °C:ssa 20 – 24 tuntia. Sekundäärinen kuiva-aine määritettiin kuivasta ja jauhetusta analyysinäytteestä pitäen näytettä lämpökaapissa 103 °C:ssa 17 tuntia. Tuhka määritettiin polttamalla näytettä muhveliuunissa (Heraeus Thermicon T, Heraeus, Hanau, Saksa) 600 °C:ssa vuorokauden ajan. Rehu- ja sontanäytteistä määritettiin NDF kuuma- ja kylmäuuttolaitteella (Teactor Fibertec System 1020 hot extractor ja 1021 cold extractor, FOSS, Hillerød, Tanska) Van Soestin ym. (1991) menetelmää käyttäen.

Raakavalkuainen määritettiin sonta- ja rehunäytteistä Kjeldahl-menetelmällä (AOAC 1995). Rehujen kokonaisrasvapitoisuus määritettiin HCl-hydrolyysin jälkeen petroolieetteriuutolla (SoxCap 2047 –hydrolyysiyksikkö, FOSS Soxtec 8000 -uuttoyksikkö, Hillerød, Tanska).

Säilörehun pH määritettiin kotieläintieteen laboratoriossa pH-mittarilla (SevenCompact™ S220, Mettler-Toledo Ltd, Leicester, Iso-Britannia). Säilörehun maitohappo ja etanoli määritettiin Barkerin ja Summersonin (1941) kolorimetrisellä menetelmällä (Shimadzu UV-VIS mini 1240, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany). Säilörehun orgaanisen aineen *in vitro* –sulavuus määritettiin käyttäen Nousiaisen ym. (2003) muunnelmaa Friedelin (1990) pepsini-sellulaasi –menetelmästä. Säilörehun D-arvo laskettiin *in vitro* –sulavuuden perusteella.

Säilörehun ja pötsinesteen haihtuvat rasvahapot määritettiin nestekromatografilla (Waters Acquity UPLC, Waters, Milford, MA, Yhdysvallat) käyttäen Waters MassTrak AAA -kolonna (186004097, Waters). Analyysissä käytettiin Puhakan ym. (2016) julkaisussa kuvattua menetelmää. Pötsinesteen pH mitattiin navettalaboration pH-mittarilla (S20 SevenEasy™ pH, Mettler-Toledo Ltd, Leicester, Iso-Britannia). Pötsinesteen alkueläinten määrä laskettiin mikroskoopilla (Type 300108, Reichert, Wien, Itävalta) laskukammiota käyttäen (Fuchs-Rosenthal, Incyto, Korea). Maitonäytteiden rasvahapot analysoitiin liekki-ionisaattorilla varustetulla kaasukromatografilla (Shimadzu QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japani) Lammisen ym. (2019a) kuvaamaa menetelmää käyttäen.

Plasman NEFA- ja β -hydroksibutyraattipitoisuudet määritettiin KONE Pro Selective Chemistry Analyzer –analysaattorilla (Thermo Electron Oy, Vantaa, Suomi) käyttäen omaa entsyymikittiä kummallekin määrittämiselle (NEFA-HR (2) kit, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Saksa ja Ranbut kit, Randox Laboratories, Crumlin, Iso-Britannia). Plasman etikkahappopitoisuuden määrittämiseen käytettiin Shimadzu UV-VIS mini 1240 –kolorimetriä (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Saksa) ja kittiä (10148261035, R-Biopharm AG, Darmstadt, Saksa).

5.5 Tulosten laskeminen ja tilastollinen käsittely

Tilastolliset analyysit tehtiin jokaisen jakson päätteeksi olleen keruuviikon (päivät 15 – 21) tuloksista. Rehun ja sonnan orgaanisen aineen pitoisuus (g/kg ka) laskettiin vähentämällä kuiva-aineesta tuhkan määrä. Säilörehun kuiva-ainekorjaus tehtiin Huidan ym. (1986) mukaan ja energiakorjattu maitotuotos (EKM) laskettiin Sjaunjan ym. (1990) menetelmän mukaan.

Ravintoaineiden sulavuudet laskettiin käyttäen merkkiaineena happoon liukenematonta tuhkaa (AIA). Kuiva-aineen näennäinen sulavuus laskettiin kaavalla:

$$1 - \frac{\text{AIA: n pitoisuus dieetin ka: ssa}}{\text{AIA: n pitoisuus sonnan ka: ssa}}$$

Muiden ravintoaineiden näennäinen sulavuus laskettiin kaavalla:

$$1 - \frac{\text{AIA: n pitoisuus dieetin ka: ssa}}{\text{AIA: n pitoisuus sonnan ka: ssa}} * \frac{\text{ravintoaineen pitoisuus sonnan ka: ssa}}{\text{ravintoaineen pitoisuus dieetin ka: ssa}}$$

Plasman virtaus maitorauhaseen määritettiin Fickin säännön mukaisella kaavalla, joka perustuu fenyylialaniinin ja tyrosiinin siirtymiseen plasmasta maidon valkuaiseen (Cant ym. 2013). Maitorauhasen ravintoaineiden otto määritettiin Halmemies-Beauchet-Filleaun ym. (2013) kuvaamalla menetelmällä.

Tilastollinen analyysi tehtiin SAS-ohjelmiston versiolla 9.3 käyttäen ohjelmiston Mixed –proseduuria (SAS Institute, Cary, NC, USA). Pötsikäymistä lukuun ottamatta varianssianalyyssissä käytettiin seuraavaa tilastomallia:

$$Y_{ijklm} = \mu + A(S)_i + S_j + P(S)_k + D_l + e_{ijklm},$$

jossa μ = keskiarvo, $A(S)$ = eläimen vaikutus neliön sisällä, S = neliön vaikutus, P = jakson vaikutus, D = käsittelyn vaikutus, $S * D$ = neliön ja käsittelyn yhdysvaikutus ja e = virhetermi.

Pötsikäymistä kuvaavien tunnuslukujen varianssianalyysissä käytettiin alla esitettyä tilastomallia:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + P_j + D_k + T_l + APD_{ijk} + AT_{il} + PT_{jl} + TD_{kl} + e_{ijklm},$$

jossa μ = keskiarvo, A = eläimen vaikutus, P = jakson vaikutus, D = käsittelyn vaikutus, T = näytteenottoajan vaikutus, APD = eläimen, jakson ja käsittelyn yhdysvaikutus, AT = eläimen ja näytteenottoajan yhdysvaikutus, PT = jakson ja näytteenottoajan yhdysvaikutus, TD = näytteenottoajan ja käsittelyn yhdysvaikutus ja e = virhetermi. Mallissa kiinteitä muuttujia olivat jakso, näytteenottoaika, käsittely sekä näiden yhdysvaikutukset. Satunnaismuuttujia olivat eläin, eläimen, jakson ja käsittelyn yhdysvaikutus sekä eläimen ja näytteenottoajan yhdysvaikutus.

Käsittelyjen väliset erot testattiin käyttäen polynomialisia kontrasteja (lineaarinen ja toisen asteen vaikutus). Tilastollista merkitsevyyttä kuvattiin käyttäen p-arvoa, jossa $p < 0,1$ tarkoitti suuntaa-antavaa tilastollista eroa ja $p < 0,05$ merkitsevää tilastollista eroa.

6 TULOKSET

6.1 Koerehujen koostumus

Säilörehun D-arvo (sulavan orgaanisen aineen pitoisuus g/kg ka) oli 656 g/kg ka (taulukko 5). Säilörehun pH oli 4,24 ja raakavalkuaisen osuus 135 g/kg ka. Sokereiden osuus säilörehussa oli 136 g/kg ka.

Rypsiivisteiden kokonaisrasvapitoisuus oli hieman pienempi kuin Spirulinassa. Spirulinan raakavalkuaispitoisuus oli lähes kaksi kertaa suurempi kuin rypsiivisteessä.

Tutkimuksessa käytetty Spirulina ei sisältänyt lainkaan neutraalidetergenttikuitua (NDF), toisin kuin rypsi, joka sisälsi sitä 272 g/kg ka.

Taulukko 5. Koerehujen koostumus

	Säilörehu	Viljaleike	Melassi- leike	Melassi	Rypsi- tiiviste	Spirulina
pH	4,24	-	-	-	-	-
Kuiva-aine, %	27,7	90,0	87,9	70,6	86,6	94,6
<i>Kuiva-aineessa, g/kg ka</i>						
Tuhka	81,7	34,3	66,8	103	66,1	71,8
NDF ¹	496	362	339	-	272	0,00
Raakavalkuainen	135	122	112	813	311	697
Kokonaisrasva	-	47,2	2,90	-	41,5	51,6
Maitohappo	27,2	-	-	-	-	-
Etikkahappo	6,80	-	-	-	-	-
Propionihappo	0,80	-	-	-	-	-
Voihappo	0,20	-	-	-	-	-
Sokerit	136	-	-	-	-	-
Ammoniumtyppi kokonaistypestä, %	6,69	-	-	-	-	-
D-arvo ² , g/kg ka	656	-	-	-	-	-

¹Neutraalidetergenttikuitu

²Sulava orgaaninen aine

Rypsin lipideihin verrattuna Spirulina-levän lipidit sisälsivät runsaasti palmitiinihappoa (taulukko 6). Spirulinan lipidit sisälsivät γ -linoleenihappoa lähes 20 g/100g rasvahappoja. Rypsin lipideissä sitä ei ollut juuri lainkaan. Sen sijaan Spirulinan öljyhappo- ja α -linoleenihappopitoisuudet olivat pienet verrattuna rypsiin. Rypsin lipidit sisälsivät lähes seitsenkertaisen määrän kertatydyttymättömiä rasvahappoja verrattuna Spirulinan lipideihin. Rypsin lipidien tyydyttymättömien rasvahappojen kokonaispitoisuus olikin selvästi suurempi kuin Spirulinan.

Taulukko 6. Koerehujen rasvahappokoostumus

	Säilörehu	Viljaleike	Melassi- leike	Melassi	Rypsi- tiiviste	Spirulina
<i>g/100g rasvahappoja</i>						
16:0	16,75	19,62	23,10	18,29	8,27	45,66
<i>cis</i> -9 16:1	0,24	0,14	0,27		0,90	2,76
<i>cis</i> -9 18:1	5,06	20,54	13,67	31,45	43,09	2,70
<i>cis</i> -11 18:1	0,70	0,98	1,39	1,29	9,23	0,62
18:2n-6	18,59	50,43	49,19	34,55	25,06	23,52
18:3n-3	47,96	4,93	8,78	7,81	8,05	0,37
18:3n-6		0,03			0,03	19,87
Tyydyttyneet rasvahapot	24,63	21,71	26,29	24,90	12,40	47,67
Kertatyydyttymättömät rasvahapot	8,14	22,81	15,32	32,74	54,34	8,03
Monityydyttymättömät rasvahapot	67,23	55,48	57,96	42,36	33,20	44,3
Tyydyttymättömät rasvahapot yhteensä	75,37	78,29	73,28	75,1	87,54	55,7

6.2 Koerehujen syönti, sulavuus ja rasvahappojen saanti

Ruokinnat eivät eronneet toisistaan säilörehun syönnin eivätkä kokonaissyönnin osalta ($p > 0,1$) (taulukko 7). Väkirehun osuus kokonaissyönnistä väheni lineaarisesti, kun Spirulinan valkuainen korvasi rypsin valkuaista ($p < 0,05$). Valkuaistäydennys lisäsi säilörehun syöntiä tilastollisesti suuntaa-antavasti ($p = 0,07$). Valkuaistäydennys myös paransi kuiva-aineen, orgaanisen aineen ja NDF:n sulavuutta verrattuna kontrolliruokintaan ($p < 0,05$). Eri valkuaisruokintojen välillä ravintoaineiden sulavuuksissa ei kuitenkaan ollut eroa ($p > 0,1$).

Taulukko 7. Valkuaistäydennyksen ja valkuaislähteen vaikutus syöntiin ja ravintoaineiden sulavuuteen.

	Käsittely				SEM	Tilastollinen merkitsevyys ¹		
	K	R	RS	S		PROT	LIN	2. aste
<i>Kuiva-aineen syönti, kg/pvä</i>								
Säilörehu	12,2	12,9	12,8	13,3	0,57	0,071	0,425	0,536
Väkirehu	10,6	10,5	10,2	9,59				
Kokonaissyönti	22,8	23,4	23	22,8	0,49	0,484	0,268	0,847
Väkirehun osuus	0,466	0,451	0,449	0,422	0,0152	0,034	0,044	0,310
<i>Sulavuus, %</i>								
Kuiva-aine	63,7	65,1	64,6	65,1	0,53	0,006	0,978	0,261
Orgaaninen aine	64,6	66,0	65,7	66,1	0,55	0,003	0,76	0,377
NDF	44,1	48,1	47,5	49,4	1,13	<0,001	0,175	0,152

K=Valkuaislisätön kontrolli, R=valkuaislisänä rypsi, RS=valkuaislisänä rypsin ja Spirulina-levän seos, S=valkuaislisänä Spirulina-levä

SEM=keskiarvon keskivirhe

¹Valkuaistäydennyksen vaikutus (PROT) sekä lineaarinen (LIN) että toisen asteen (2. aste) vaikutus Spirulinan valkuaisen korvatussa rypsin valkuaista

Kun Spirulinan valkuainen korvasi rypsin valkuaista ruokinnassa, öljyhapon ja *cis*-vakseenihapon saanti väheni lineaarisesti ($p < 0,001$) (taulukko 8). Sen sijaan palmitiinihapon ja γ -linoleenihapon saanti lisääntyi sitä mukaa, kun Spirulinan valkuainen korvasi rypsin valkuaista ($p < 0,001$). Tyydyttymättömien rasvahappojen saanti sekä rasvahappojen kokonaissaanti vähenivät lineaarisesti Spirulinan määrän lisääntyessä ruokinnassa ($p < 0,001$ ja $p = 0,05$). Linolihapon ja α -linoleenihapon saanneissa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja valkuaisruokintojen välillä ($p > 0,1$).

Taulukko 8. Valkuaistäydennyksen ja valkuaislähteen vaikutus lypsylehmien rasvahappojen saantiin.

g/pv	Käsittely					Tilastollinen merkitsevyys ¹			
	n	K	R	RS	S	SEM	PROT	LIN	2. aste
16:0	32	82,0	76,1	82,4	87,4	1,27	0,972	<0,001	0,627
18:0	32	7,25	8,25	7,74	7,16	0,149	0,001	<0,001	0,798
<i>cis</i> -9 18:1	32	62,7	76,9	65,4	52,9	0,76	0,017	<0,001	0,626
<i>cis</i> -11 18:1	32	3,51	8,84	6,02	3,32	0,057	<0,001	<0,001	0,339
18:2n-6	32	165	150	150	147	1,91	<0,001	0,358	0,509
18:3n-3	32	98,4	105	102	104	3,9	0,079	0,742	0,522
18:3n-6	32	0,08	0,08	3,17	5,83	0,118	<0,001	<0,001	0,157
Pitkäketjuiset (\geq C18) rasvahapot ²	31	345	364	350	335	5,09	0,298	<0,001	0,962
Tyydyttyneet rasvahapot ²	31	100	98,6	104	109	1,68	0,014	<0,001	0,689
Kertatyydyttymättömät rasvahapot	32	73,7	93,9	79,7	64,6	1,64	<0,001	<0,001	0,686
Monityydyttymättömät rasvahapot ²	31	260	256	257	258	4,31	0,344	0,507	0,963
Tyydyttymättömät rasvahapot yhteensä ²	31	333	350	337	323	4,79	0,338	<0,001	0,933
Rasvahappojen kokonaissaanti	32	441	449	441	432	7,1	0,885	0,049	0,909

K=Valkuaislisätön kontrolli, R=valkuaislisänä rypsi, RS=valkuaislisänä rypsin ja Spirulina-levän seos, S=valkuaislisänä Spirulina-levä

SEM=keskiarvon keskivirhe

¹Valkuaistäydennyksen vaikutus (PROT) sekä lineaarinen (LIN) että toisen asteen (2. aste) vaikutus Spirulinan valkuaisen korvatessa rypsin valkuaista

²Poistettu yksi residuaaliltaan poikkeava havainto (poikkeama 2,5 * keskihajonta). Suurin SEM kontrolliruokinnassa, muiden ruokintojen SEM saadaan kertomalla esitetty SEM luvulla 0,96.

6.3 Maitotuotos ja maidon koostumus

Maitotuotoksessa ei ollut eroja käsittelyjen välillä (taulukko 9). Eroja ei myöskään ollut EKM-, rasva-, valkuais- tai laktoosituotoksessa ($p>0,1$). Spirulinan korvatussa rypsiä valkuaisuotosta väheni lineaarisesti tilastollisesti suuntaa-antavasti ($p=0,06$).

Taulukko 9. Valkuaistäydennyksen ja valkuaislähteen vaikutus maitotuotokseen ja maidon koostumukseen.

	Käsittely				SEM	Tilastollinen merkitsevyys ²		
	K	R	RS	S		PROT	LIN	2. aste
<i>Tuotos</i>								
Maito, kg/pv	26,7	28,0	27,3	27,3	1,02	0,220	0,375	0,592
EKM ¹ , kg/pv	28,7	30,3	29,1	29,6	1,39	0,105	0,314	0,189
Rasva, g/pv	1230	1300	1260	1290	75,1	0,103	0,767	0,279
Proteiini, g/pv	999	1050	997	1000	31,5	0,352	0,059	0,161
Laktoosi, g/pv	1110	1180	1120	1130	56,2	0,218	0,198	0,303
<i>Koostumus</i>								
Rasva, %	4,62	4,65	4,58	4,69	0,183	0,866	0,742	0,434
Proteiini, %	3,75	3,75	3,67	3,69	0,083	0,376	0,403	0,431
Laktoosi, %	4,14	4,19	4,07	4,12	0,074	0,812	0,203	0,095

K=Valkuaislisätön kontrolli, R=valkuaislisänä rypsiä sisältävä, RS=valkuaislisänä rypsiä sisältävän ja Spirulina-levän seos, S=valkuaislisänä Spirulina-levä

¹Energiakorjattu maito

²Valkuaislisäyksen vaikutus (PROT) sekä lineaarinen (LIN) että toisen asteen (2. aste) vaikutus Spirulinan valkuaisen korvatussa rypsin valkuaisista

6.4 Maidon rasvahappokoostumus

Kun Spirulinan valkuainen korvasi rypsin valkuaisista, maitorasvan palmitiini- ja palmitoleiinihappopitoisuudet lisääntyivät lineaarisesti ($p<0,001$) (taulukko 12). Samoin maitorasvan voihappopitoisuus lisääntyi lineaarisesti ($p<0,05$). Tyydyttymättömien rasvahappojen osalta leväruokintaa käytettäessä maitorasvan γ -linoleeni- ja arakidonihappopitoisuudet lisääntyivät lineaarisesti verrattuna rypsiä sisältävään ruokintaan ($p<0,001$). Valkuaistäydennys vähensi monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuutta maitorasvassa ($p<0,001$). Spirulinan korvatussa rypsin valkuaisista, maitorasvan monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus väheni käyräviivaisesti tilastollisesti suuntaa-antavasti ($p=0,09$). Spirulina vähensi maitorasvan rumeeni- ja steariinihappopitoisuutta käyräviivaisesti ($p<0,05$) ja steariinihappopitoisuutta lineaarisesti ($p<0,01$).

Taulukko 12. Valkuaistäydennyksen ja eri valkuaislähteiden vaikutus maitorasvan rasvahappokoostumukseen (n=32).

g/100g rasvahappoja	Käsittely				SEM	Tilastollinen merkitsevyys ¹		
	K	R	RS	S		PROT	LIN	2. aste
4:0	3,58	3,56	3,64	3,68	0,048	0,258	0,028	0,560
6:0	2,41	2,40	2,42	2,42	0,041	0,947	0,499	0,483
8:0	1,60	1,55	1,54	1,52	0,051	0,243	0,627	0,831
10:0	3,47	3,57	3,56	3,42	0,077	0,596	0,144	0,500
12:0	3,90	4,14	4,10	3,96	0,084	0,102	0,137	0,593
14:0	11,8	12,1	12,0	12,0	0,14	0,136	0,316	0,960
16:0	28,5	27,5	28,4	29,5	0,55	0,934	<0,001	0,757
iso 16:0	0,24	0,26	0,26	0,27	0,012	0,032	0,410	0,964
cis-9 16:1	0,94	0,92	0,96	1,09	0,039	0,103	<0,001	0,195
18:0	11,6	11,6	11,5	10,7	0,35	0,204	0,007	0,137
cis-9 18:1 + trans-15 18:1	17,3	17,4	17,0	17,0	0,45	0,707	0,357	0,591
trans-10 18:1	0,23	0,23	0,21	0,21	0,010	0,320	0,188	0,392
cis-11 18:1	0,39	0,53	0,46	0,41	0,019	0,004	<0,001	0,630
trans-11 18:1	1,10	1,35	1,25	1,17	0,065	<0,001	<0,001	0,678
18:2n-6	2,41	1,95	2,02	1,90	0,118	<0,001	0,529	0,138
cis-9,trans-11 18:2	0,36	0,57	0,51	0,51	0,028	<0,001	0,002	0,019
trans-11,cis-15 18:2	0,14	0,16	0,15	0,16	0,012	0,073	0,889	0,053
18:3n-3	0,54	0,51	0,50	0,49	0,002	<0,001	0,087	0,934
18:3n-6	0,04	0,03	0,05	0,06	0,003	<0,001	<0,001	0,230
20:4n-6	0,101	0,095	0,100	0,103	0,0041	0,387	<0,001	0,323
Tunnistamattomat rasvahapot	1,13	1,15	1,10	1,11	0,038	0,522	0,021	0,055
De novo -rasvahapot (≤ C14)	28,5	29,1	29,1	28,8	0,157	0,167	0,333	0,747
Pitkäketjuiset rasvahapot (≥ C18)	40,4	40,9	39,9	38,6	0,380	0,347	0,009	0,090
Tyydyttymättömät rasvahapot	71,0	70,7	71,5	71,5	0,70	0,535	0,190	0,500
Kertydyttymättömät rasvahapot	24,0	24,5	23,8	23,9	0,55	0,819	0,223	0,433
Monitydyttymättömät rasvahapot	3,95	3,57	3,59	3,50	0,167	<0,001	0,303	0,335

K=Valkuaislisätön kontrolli, R=valkuaislisänä rypsi, RS=valkuaislisänä rypsin ja Spirulina-levän seos, S=valkuaislisänä Spirulina-levä

¹Valkuaistäydennyksen vaikutus (PROT) sekä lineaarinen (LIN) että toisen asteen (2. aste) vaikutus Spirulinan valkuaisen korvatussa rypsin valkuaisista

6.5 Pötsikäyminen, plasman energiametaboliitit ja maitorauhasen ravintoaineiden otto

Pötsin happamuudessa ja kokonais-VFA:n tuotannossa ei ollut eroja eri käsittelyissä (taulukko 10). Pötsin haihtuvien päärasvahappojen moolisuhteisiin rypsin valkuaisen korvaaminen Spirulinan valkuaisella ei vaikuttanut ($p>0,1$). Sen sijaan Spirulinan valkuaisen korvatussa rypsin valkuaisista isovoihapon ja isovaleriaanahapon mooliosuus

pötsinesteen VFA:sta lisääntyi lineaarisesti ($p<0,01$). Samoin vaikutti myös valkuaislisäys ruokinnassa ($p>0,05$).

Taulukko 10. Valkuaistäydennyksen ja valkuaislähteiden vaikutus pötsikäymiseen (n=16).

	Käsittely					Tilastollinen merkitsevyys ¹		
	K	R	RS	S	SEM	PROT	LIN	2. aste
<i>pH</i>	6,23	6,20	6,19	6,19	0,065	0,364	0,788	0,921
Kokonais-VFA, mmol/l	97,8	101	99,5	99,2	3,46	0,189	0,430	0,770
<i>Mooliosuus mmol/mol</i>								
Etikkahappo	657	658	660	655	2,4	0,879	0,333	0,207
Propionihappo	172	171	171	172	2,6	0,675	0,869	0,684
Voihappo	140	139	138	140	2,5	0,561	0,637	0,517
Isovoihappo	7,98	8,39	8,49	9,20	0,276	0,026	0,034	0,281
Valeriaanahappo	13,3	14,2	13,5	13,8	0,30	0,153	0,397	0,268
Isovaleriaanahappo	3,14	3,64	3,87	4,43	0,139	0,001	0,002	0,227
Kapronihappo	6,72	6,13	5,94	6,40	0,179	0,022	0,274	0,138
<i>Moolisuhteet</i>								
Etikkahappo/ propionihappo	3,85	3,87	3,90	3,84	0,064	0,699	0,726	0,397
(Etikkahappo +voihappo)/ propionihappo	4,67	4,68	4,72	4,66	0,084	0,772	0,813	0,500
Alkueläimet, x 10 ⁵ yks/ml	11,2	10,5	10,9	10,9	0,86	0,589	0,632	0,765

K=Valkuaislisätön kontrolli, R=valkuaislisänä rypsi, RS=valkuaislisänä rypsin ja Spirulina-levän seos, S=valkuaislisänä Spirulina-levä

¹Valkuaisäydennyksen vaikutus (PROT) sekä lineaarinen (LIN) että toisen asteen (2. aste) vaikutus Spirulinan valkuaisen korvatussa rypsin valkuaista

Valkuaisäydennyksen ja eri valkuaislähteiden vaikutus plasman virtaukseen, energiametaboliitteihin ja maitorauhasen ravintoaineiden ottoon on esitetty taulukossa 11. Spirulinan valkuaisen korvatussa ruokinnassa rypsin valkuaista valtimoveren plasman vapaiden rasvahappojen (NEFA) pitoisuus lisääntyi lineaarisesti ($p<0,05$). Lisäksi valtimoveren plasman β -hydroksibutyraattipitoisuus lisääntyi lineaarisesti suuntaa-antavasti ($p=0,096$). Spirulinan valkuaisen korvatussa puolet rypsin valkuaisesta valtimoveren plasman insuliinipitoisuus lisääntyi tilastollisesti suuntaa-antavasti, kun taas Spirulinan korvatussa rypsin valkuaisen kokonaan plasman insuliinipitoisuus väheni tilastollisesti suuntaa-antavasti ($p=0,071$). Valtimoveren etikkahappo- ja glukoosipitoisuuksiin Spirulina ei vaikuttanut ($p>0,1$).

Taulukko 11. Valkuaislisän vaikutus plasman virtaukseen, energiametaboliitteihin ja maitorauhasen ravintoaineiden ottoon.

	n	Käsittely				SEM	Tilastollinen merkitsevyys ¹		
		K	R	RS	S		PROT	LIN	2. aste
<i>Plasman virtaus</i>									
l/pv	16	14100	13900	14200	11700	962,4	0,407	0,091	0,204
l/kg maitoa	16	521	473	474	411	36,5	0,059	0,134	0,338
<i>Valtimoveren pitoisuudet, mmol/l</i>									
Etikkahappo,	32	1,60	1,44	1,56	1,55	0,100	0,321	0,310	0,561
BHBA ²	32	0,823	0,788	0,854	0,872	0,0496	0,716	0,096	0,570
Glukoosi	32	3,64	3,58	3,59	3,56	0,084	0,255	0,767	0,758
Insuliini, μ IU/ml	32	13,1	14,5	16,9	12,9	2,19	0,308	0,420	0,071
NEFA ^{3,4}	32	-1,02 (0,097)	-1,05 (0,089)	-1,01 (0,100)	-0,980 (0,114)	0,0387	0,796	0,033	0,797
<i>Valtimo-laskimo erotus, mmol/l</i>									
Etikkahappo	16	1,04	1,10	0,98	1,02	0,141	0,972	0,664	0,572
BHBA	16	0,275	0,368	0,338	0,340	0,0420	0,070	0,525	0,662
Glukoosi ⁵	16	0,554 (0,742)	0,747 (0,850)	0,714 (0,833)	0,691 (0,825)	0,087	0,139	0,653	0,964
NEFA	16	-0,050	-0,039	-0,042	-0,023	0,010	0,114	0,179	0,274
<i>Maitorauhasen otto, g/kg maitoa</i>									
Etikkahappo	16	32,0	32,1	27,7	25,7	4,84	0,389	0,216	0,768
BHBA	16	14,8	18,6	16,7	14,8	2,71	0,369	0,163	0,993
Glukoosi ⁴	16	1,83 (69,5)	1,85 (72,1)	1,84 (69,9)	1,78 (60,5)	0,019	0,494	0,007	0,114
NEFA	16	-7,41	-5,18	-5,67	-2,53	1,381	0,037	0,098	0,172
<i>Maitorauhasen otto, mol/pv</i>									
Etikkahappo	16	14,7	15,7	14,0	12,0	2,28	0,697	0,177	0,970
BHBA	16	3,90	5,25	4,93	4,04	0,738	0,192	0,132	0,658
Glukoosi	16	10,4	11,9	11,6	9,53	0,677	0,016	<0,001	0,004
NEFA	16	-0,702	-0,534	-0,600	-0,214	0,1467	0,114	0,105	0,171

K=Valkuaislisätön kontrolli, R=valkuaislisänä rypsi, RS=valkuaislisänä rypsin ja Spirulina-levän seos, S=valkuaislisänä Spirulina-levä

¹Valkuaistäydennyksen vaikutus (PROT) sekä lineaarinen (LIN) että toisen asteen (2. aste) vaikutus Spirulinan valkuaisen korvatussa rypsin valkuaista

² β -hydroksibutyraatti, ³Vapaat rasvahapot, ⁴Valtimoveren plasman NEFA-pitoisuuden ja maitorauhasen glukoosin oton logaritminen muunnos, alkuperäiset arvot ovat esitetty sulkeissa.

⁵Glukoosin valtimo-laskimo-erotuksen neliömuunnos, alkuperäiset arvot ovat esitetty sulkeissa

7 TULOSTEN TARKASTELU

7.1 Koerehujen koostumus

Hyvän säilörehun D-arvon tavoitearvo on yli 680 g/kg ka ja raakavalkuaispitoisuus 130 – 170 g/kg ka (Jaakkola ym. 2010). Tutkimuksessa käytetyn säilörehun D-arvo oli selvästi tavoitearvoa pienempi (656 g/kg ka), joten säilörehun energiapitoisuus oli pieni. Säilönnälliseltä laadultaan tutkimuksessa käytetty säilörehu oli hyvää. Lisäksi säilörehun raakavalkuaispitoisuus (135 g/kg ka) oli tavoitearvoissa.

Beckerin (2013) mukaan Spirulina-levissä ei ole selluloosapitoista soluseinämääainesta. Tässä tutkimuksessa käytetty mikrolevä ei sisältänyt lainkaan NDF-kuitua, kuten ei myöskään Lammisen ym. (2019ab) tutkimuksissa käytetty Spirulina. Kuitenkin Panjaitanin ym. (2015) tutkimuksessa Spirulina sisälsi NDF-kuitua 35 g/kg ka. Lammisen ym. (2017) mukaan onkin mahdollista, että perinteinen NDF-määritys ei välttämättä ole parhaiten soveltuva pienten, yksisoluisten mikrolevien kuituanalyysimenetelmä.

Koekäsittelyjä suunniteltaessa oli otettu huomioon rypsin ja mikrolevän ero raakavalkuaispitoisuudessa. Käsittelety olivat isonitrogeenisää eli raakavalkuaisen saanti valkuaisrehuista oli kussakin koekäsittelyssä sama. Tutkimuksessa käytetyn rypsiitiivisten raakavalkuaispitoisuus oli 311 g/kg ka, mikä on jonkin verran pienempi kuin Luonnonvarakeskuksen rehutaulukoissa (2019) ilmoittama rypsi- ja rapsirouheen sekä rypsi- ja rapsipuristeen raakavalkuaispitoisuus (379 g/kg ka ja 358 g/kg ka). Tässä tutkimuksessa käytetyn Spirulinan raakavalkuaispitoisuus oli 697 g/kg ka, mikä on lähes kaksi kertaa suurempi kuin tutkimuksessa käytetyn rypsiitiivisten raakavalkuaispitoisuus. Muissakin tutkimuksissa Spirulinan raakavalkuaispitoisuus on ollut samaa tasoa kuin tässä kokeessa. Esimerkiksi Lammisen ym. (2019a) tutkimuksessa Spirulinan raakavalkuaispitoisuus oli 683 g/kg ka, Costan ym. (2016) 675 g/kg ja Panjaitanin ym. (2015) 716 g/kg ka.

Tässä tutkimuksessa käytetyn Spirulinan kokonaisrasvapitoisuus oli (51,6 g/kg ka), joka oli selvästi pienempi kuin Spirulinan raakaravapitoisuus Panjaitanin ym. (2015) ja

Costan ym. (2016) tutkimuksissa (100 g/kg ka ja 114 g/kg ka). Erot mikrolevien rasvapitoisuudessa saattavat osittain johtua rasvapitoisuuden erilaisista määritysmenetelmistä. Mikrolevien kemialliseen koostumukseen vaikuttavat suuresti niiden viljelytekniikka ja kasvatusolosuhteet, mitkä kuitenkin selittänevät vaihtelun mikrolevien koostumuksessa eri tutkimusten välillä (Mata ym. 2010, Markou ja Georgakakis 2011). Valkuaisrehuna käytettävät rypsi ja rapsi ovat kasviöljyteollisuuden sivutuotteita ja niiden rasvapitoisuus riippuu niissä jäljellä olevan öljyn määrästä, mikä taas riippuu rypsin ja rapsin käsittelytavasta (Tuori 1992). Rypsi- ja rapsirouheen rasvapitoisuus on pienempi kuin puristeiden. Rouheen raakaraspitoisuus vaihtelee 6 – 54 g/kg ka, kun taas puristeissa raakaraspitoisuus on 56 – 226 g/kg ka (Heuze ym. 2019).

Rypsin ja Spirulinan lipidien koostumuksessa oli eroja. Spirulinan lipidit sisälsivät enemmän tyydyttyneitä rasvahappoja kuin rypsi, etenkin palmitiinihapon osuus Spirulinan rasvahapoissa oli suuri. Rypsin lipidit sen sijaan sisälsivät selvästi Spirulinan lipidejä enemmän kertatyydyttymättömiä rasvahappoja, erityisesti öljyhappoa. Monityydyttymättömistä rasvahapoista rypsi sisälsi Spirulinaa enemmän linolihappoa. Öljyhappo ja linolihappo ovatkin yleisimmät rypsin sisältämät rasvahapot (Bojanowska 2017, Sakhno 2019). Spirulina sisälsi jonkin verran enemmän monityydyttymättömiä rasvahappoja kuin rypsi. Spirulinan rasvahapoista γ -linoleenihapon osuus oli runsas, rypsi ei sen sijaan sisältänyt sitä juuri lainkaan. Perinteisissä kotieläinten rehuissa γ -linoleenihappoa onkin hyvin vähän. Spirulina on yksi eniten γ -linoleenihappoa sisältävistä mikrolevistä (Tanticharoen ym. 1994). Verrattuna esimerkiksi *Chlorella pyrenoidosa* -mikrolevään Spirulinan sisältämä γ -linoleenihappopitoisuus on yli 40-kertainen (Ötles ja Pire 2001). Runsaasti γ -linoleenihappoa on myös esimerkiksi mustaherukan, iltahelokin ja rohtopurasruohon siemenistä saatavassa öljyssä (Lawson ja Hughes 1988).

7.2 Koerehujen syönti, sulavuus ja rasvahappojen saanti

Valkuaistäydennys lisäsi säilörehun syöntiä tilastollisesti suuntaa-antavasti verrattuna kontrolliruokintaan, mikä on linjassa aikaisempien tutkimusten kanssa (Huhtanen 1998,

Huhtanen ym. 2011). Lisääntynyt syönti voi olla seurausta kuidun nopeammasta sulatuksesta pötsissä (Oldham 1984). Tässä tutkimuksessa valkuaislisäys paransikin NDF:n sulavuutta sekä kuiva-aineen ja orgaanisen aineen sulavuutta. Rypsi- ja leväruokinnossa ei kuitenkaan ollut eroja eri ravintoaineiden sulavuuksissa. Kuidun nopeampi sulatus ei kokonaan selitä syönnin lisääntymistä valkuaiäydennystä käytettäessä, vaan lisäys voi johtua myös valkuaiäydennyksen vaikutuksesta eläimen aineenvaihduntaan (Huhtanen ym. 2011). Valkuaiäydennyksen on havaittu lisäävän maitotuotosta, joten on mahdollista, että syönnin lisäys johtuu lisääntyneestä energiatarpeesta (Huhtanen ym. 2011). Tässä tutkimuksessa valkuaiäydennys ei kuitenkaan lisännyt maitotuotosta.

Väkirehun osuus syönnistä väheni lineaarisesti, kun Spirulinan valkuainen korvasi rypsin valkuaista. Tämä johtui todennäköisesti Spirulinan huonommasta maittavuudesta verrattuna rypsiin. Mikrolevien maittavuutta saattavat heikentää levien maku, tuoksu tai ravitsemukselliset ominaisuudet (Lamminen ym. 2017). Kokonaissyönnissä ei kuitenkaan ollut eroja eri käsittelyjen välillä, mikä viittaa siihen, että lehmät kompensoivat vähentyntä väkirehun syöntiä syömällä enemmän säilörehua leväruokinnossa verrattuna kontrolli- ja rypsirookintaan. Muissa tutkimuksissa on havaittu, että väkirehun syönnin väheneminen lisää säilörehun syöntiä (Huhtanen ym. 2008). Tutkimustulokset mikrolevien vaikutuksesta syöntiin vaihtelevat. Lammisen ym. (2019a) tutkimuksessa seosrehun syönti väheni Spirulinan korvatussa puolet rypsin tai härkäpavun valkuaisesta. Sen sijaan Panjaitanin ym. (2015) tutkimuksessa ei havaittu eroa kokonaissyönnissä käsittelyjen välillä, kun valkuaiäydennyksenä käytettiin urean ja ammoniumsulfaatin seosta ja Spirulinaa. Syönnissä ei ollut eroja myöskään Lammisen ym. (2017) kokeessa 1, kun *Chlorella vulgaris* -levän ja Spirulina-levän seos korvasi rypsin valkuaista. Lammisen ym. (2019b) tutkimuksessa *Nannochloropsis gaditana* -levän ja *Chlorella vulgaris* -levän seos sen sijaan vähensi väkirehun syöntiä enemmän kuin Spirulina tai *Chlorella vulgaris*. Onkin mahdollista, että mikrolevien maittavuus vaihtelee eri levälajien välillä. Mikrolevien maittavuudessa lehmille voi olla myös yksilöiden välisiä eroja (Lamminen ym. 2019a).

Rehun maittavuuteen voi vaikuttaa myös mikrolevän määrä ruokinnassa. Tässä tutkimuksessa rypsi-Spirulina -ruokinnan päivittäisen väkirehuannoksen kuiva-aineesta Spirulinaa oli 0,57 kg ja valkuaisrehun ollessa pelkkää mikrolevää sitä oli 1,13 kg.

Lammisen ym. (2017) kokeessa 1 rypsi-mikrolevä -ruokinnassa *Chlorella vulgaris* -levän ja Spirulinan seosta (1:1) oli 0,47 kg/pv ja mikrolevä-ruokinnassa sitä oli 0,94 kg/pv eikä kokonaissyönnissä ollut käsittelyjen välillä eroa. Toisaalta Lammisen ym. (2019a) tutkimuksessa mikrolevää oli valkuaisrehuseosannoksissa vain 0,26 kg/pv ja syönti väheni silti. Erot syönnissä ovat kuitenkin todennäköisesti johtuneet erilaisesta ruokinnan toteutuksesta. Lammisen ym. (2017) kokeessa 1 oli erillisruokinta, kuten tässäkin tutkimuksessa. Sen sijaan Lammisen ym. (2019a) tutkimuksessa ruokinta toteutettiin seosrehuruokintana, jolloin mikroleväruokinnoissa lehmillä ei ole ollut mahdollisuutta suosia rehua, joka ei sisältänyt levää.

Rasvahappojen kokonaissaanti vaihteli eri ruokinnoissa 432 – 449 grammaan päivässä. Rasvahappojen saanti heijasti rehujen rasvahappokoostumusta. Valkuaistäydennys lisäsi öljyhapon saantia selvästi, mikä johtui rypsin suuresta öljyhappopitoisuudesta. Tämä näkyi myös kertatydyttymättömien rasvahappojen saannissa. Valkuaistäydennys lisäsi myös α -linoleenihapon saantia tilastollisesti suuntaa-antavasti, mikä todennäköisesti johtui lisääntyneestä säilörehun syönnistä valkuaisruokinnoissa. Nurmi onkin lypsylehmien merkittävin α -linoleenihapon lähde. Spirulinan lipidit sisälsivät rypsin lipidejä enemmän tyydyttyneitä rasvahappoja ja niiden saanti lisääntyikin sitä mukaa, kun Spirulina korvasi rypsin valkuaista. Vaikka mikrolevän lipidit sisälsivät jonkin verran rypsin lipidejä enemmän monitydyttymättömiä rasvahappoja, ei niiden saannissa ollut eroa rypsi-ruokintaan.

7.3 Maitotuotos ja maidon koostumus

Maitotuotoksessa ei ollut eroja eri ruokintojen välillä, vaikka valkuaisäydennyksen on havaittu lisäävän maitotuotosta (Huhtanen 1998, Huhtanen ym. 2011). Huhtasen (1998) mukaan valkuaisäydennyksen lisäämä maitotuotos ei perustu pelkästään lisääntyneeseen säilörehun syöntiin, vaan se voi johtua tasapainoisemmasta aminohappojen saannista ja/tai maitorauhasen lisääntyneestä ravintoaineiden otosta. Mertensin (1994, s. 450) ja Hristovin ym. (1994) mukaan eniten maitotuotokseen vaikuttava tekijä kuitenkin on kuiva-aineen syönti, jossa ei tässä tutkimuksessa ollut eroja eri käsittelyiden välillä. Koska tässä tutkimuksessa säilörehun energia-arvo (10,5 MJ/kg ka) oli pieni, on mahdollista, että energiansaanti rajoitti valkuaisen hyväksikäyttöä eikä

maitotuotosvastetta saatu valkuaiätydennyksestä huolimatta. Koska väkirehun syönti väheni mikroleväruokinnossa, on se saattanut vähentää lehmien energiansaantia edelleen ja voi täten selittää maitotuotosvasteen puuttumista. Lisäksi tuotoskauden vaihe voi vaikuttaa valkuaiätydennyksen maitotuotosvasteeseen. Kalscheurin ym. (1999) tutkimuksessa havaittiin, ettei valkuaiätydennys keski- ja loppulaktaatiossa lisännyt maitotuotosta. Cyriacin ym. (2008) ja Kidanen ym. (2018) tutkimuksissa pötsihajoavan valkuaisen tai raakavalkuaisen vähentäminen ei vaikuttanut maitotuotokseen keski- ja loppulaktaatiossa.

Rypsin valkuaisen korvaaminen Spirulinan valkuaisella ei vaikuttanut maitotuotokseen. Pääsääntöisesti mikrolevät eivät ole aikaisemmissa tutkimuksissa vähentäneet maitotuotosta (Lamminen ym. 2019b, Angulo ym. 2012, Glover ym. 2012). Lammisen ym. (2019a) tutkimuksessa maitotuotos kuitenkin väheni Spirulinan korvauksessa osittain rypsin valkuaista. Sen sijaan Spirulinan korvauksessa härkäpavun valkuaista maitotuotos lisääntyi, mikä on Lammisen ym. (2019a) mukaan todennäköisesti johtunut perusdieettien erilaisesta aminohappokoostumuksesta tai valkuaisen pötsihajoavuudesta. Härkäpavun valkuaisen tiedetään sisältävän vähän metioniinia ja metioniinia runsaammin sisältävä Spirulina lieneekin täydentänyt ruokintaa siltä osin.

Tässä tutkimuksessa rasvatuotos ei eronnut eri ruokinnossa, kuten ei myöskään Lammisen ym. (2017 koe 1, 2019a) tutkimuksissa. Eräissä tutkimuksissa mikrolevät ovat kuitenkin vähentäneet rasvatuotosta (Moate ym. 2013, Angulo ym. 2012, Franklin ym. 1999). Kyseisissä tutkimuksissa on kuitenkin käytetty mikrolevävalmisteita, jotka ovat sisältäneet runsaasti dokosaheksaeenihappoa (DHA). Monityydyttymättömien rasvahappojen, kuten edellä mainitun DHA:n, tiedetään vähentävän maitorasvan synteesiä. Boackertin ym. (2007) tutkimuksessa DHA-rikastettu mikrolevävalmiste lisäsi *trans*-11 18:1 –rasvahapon konsentraatiota pötsinesteessä. Shingfieldin ym. (2010) mukaan ruuansulatuskanavaan infusoitu *trans*-11 18:1 –rasvahappo vähentää maitorauhasen rasvasynteesiä. Tässä tutkimuksessa mikrolevät eivät sisältäneet lainkaan DHA:a, joten rasvatuotoksen ei odotettukaan vähenevän. Lisäksi dieetit olivat kokonaisuudessaan vähärasvaisia rasvahappojen kokonaissaannin ollessa 441 – 432 g/pv. Esimerkiksi Shingfieldin ym. (2008) tutkimuksessa auringonkukkaöljyn annostuksen lisääminen 750 grammaan päivässä, jolloin rasvahappojen kokonaissaanti oli 923 g/pv, ei vaikuttanut rasvatuotokseen karkearehuvaltaisessa ruokinnassa.

Valkuaistäydennys ei lisännyt tässä tutkimuksessa valkuaistuotosta, mikä on ristiriidassa aikaisempien tutkimusten kanssa. Valkuaistuotoksen on havaittu lisääntyvän, kun rypsi on korvannut osan väkirehusta nurmisäilörehuvaltaisessa ruokinnassa (Huhtanen 1998). Koska valkuaistuotos väheni tilastollisesti suuntaa-antavasti Spirulinan korvatesa rypsin valkuaista, on mahdollista, että se näkyy valkuaistuotosvasteen puuttumisena verrattessa valkualsruokintoja kontrolliruokintaan. Valkuaistuotos väheni myös Lammisen ym. (2019b) tutkimuksessa Spirulinan korvatesa osittain rypsin valkuaista. Samassa tutkimuksessa valkuaistuotos sen sijaan lisääntyi, kun Spirulina korvasi härkävun valkuaista.

Maidon rasva- ja valkuaispitoisuuksiin eri ruokinnat eivät vaikuttaneet. Lammisen ym. (2019a) tutkimuksessa maidon rasva- ja valkuaispitoisuus lisääntyivät Spirulinan korvatesa osittain rypsin valkuaista, kun taas mikrolevän korvatesa härkävun valkuaista samassa tutkimuksessa, maidon rasva- ja valkuaispitoisuus vähenivät. Muutokset maidon pitoisuuksissa Lammisen ym. (2019a) tutkimuksessa ovat todennäköisesti johtuneet maitomäärän muutoksista eri ruokinnoissa.

7.4 Maidon rasvahappokoostumus

Koska rasvahappojen saanti tässä tutkimuksessa oli selvästi vähäisempää kuin tutkimuksissa, joissa maidon rasvahappokoostumusta on pyritty muuttamaan ruokinnalla, ei maidon rasvahappokoostumuksessa odotettu olevan suuria muutoksia. Esimerkiksi Halmemies-Beauchet-Filleaun ym. (2011) tutkimuksessa rasvahappojen kokonaissaanti vaihteli 609 – 876 g/pv, kun taas tässä tutkimuksessa rasvahappojen kokonaissaanti oli 441 – 449 g/pv. Halmemies-Beauchet-Filleaun ym. (2011) tutkimuksessa maitorasvan tyydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus lisääntyikin 4g/100g rasvahappoja rasvahappojen kokonaissaannin lisääntyessä. Tässä tutkimuksessa monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus maitorasvassa väheni tilastollisesti merkitsevästi valkualsruokinnoissa, mutta ainoastaan 0,45 g/100g rasvahappoja. Monitydyttymättömien rasvahappojen saannissa ei tässä tutkimuksessa kuitenkaan ollut eroja kontrolliruokinnan ja valkuaistäydennyksen välillä. Monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus maidossa on riippuvainen niiden metaboliasta pötsissä, johon

vaikuttaa esimerkiksi pötsin pH (Shingfield ym. 2008). Pötsin pH:ssa ei kuitenkaan havaittu eroa koeruokintojen välillä tässä kokeessa. On kuitenkin mahdollista, että kontrolliruokinnassa, jolloin myös väkirehun syönti oli suurinta, pötsin pH on ollut hetkellisesti pienempi kuin valkuaisruokinnoissa. Tällöin kontrolliruokinnassa rasvahappojen biohydrogenaatio pötsissä on saattanut olla vähäisempää ja pötsistä on virrannut eteenpäin enemmän monitydyttymättömiä rasvahappoja kuin valkuaisruokinnoissa. Yksittäisistä monitydyttymättömistä rasvahapoista valkuaisruokinnassa vähensi maitorasvan linoli- ja α -linoleenihappopitoisuuksia ja lisäsi γ -linoleenihappopitoisuutta, mutta muutokset olivat määrällisesti erittäin pieniä. Koska linolihapon saanti väheni ja γ -linoleenihapon saanti lisääntyi valkuaisruokinnoissa, olivat tulokset odotettavissa. Sen sijaan valkuaisruokinnassa lisäsi α -linoleenihapon saantia tilastollisesti suuntaa-antavasti.

Valkuaislisä ei vaikuttanut tyydyttyneiden eikä kertatydyttymättömien rasvahappojen kokonaispitoisuuteen maitorasvassa. Tyydyttyneiden rasvahappojen saannissa tai maitorauhasen etikkahapon ja β -hydroksibutyraatin otossa ei ollut eroja kontrolliruokinnan ja valkuaisruokintojen välillä. Vaikka rypsiä sisältävissä ruokinnoissa kertatydyttymättömien rasvahappojen saanti oli hieman runsaampaa kontrolliruokintaan verrattuna, se ei heijastunut kertatydyttymättömien rasvahappojen pitoisuuteen maitorasvassa. Pötsin voimakkaan biohydrogenaation vuoksi tulos oli odotettavissa.

Eri valkuaisruokintojen välillä maitorasvan tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuudessa ei ollut eroja, vaikka *Spirulina* lisäsi niiden saantia 98,6 grammasta päivässä 109 grammaan päivässä. Ero saannissa on ollut todennäköisesti niin pieni, ettei muutosta maitorasvassa havaittu. Maitorasvan kerta- ja monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuudessakaan ei ollut eroja rypsi- ja *Spirulina*-ruokintojen välillä. *Spirulina* ja rypsin vaikutuksia maitorasvan rasvahappokoostumukseen on verrattu tutkimuksissa vähän. Ylisen (2014) maisterintutkielmassa *Spirulina* ja *Chlorella vulgaris* -levyä (1:1) sisältävä valkuaisruokinnassa lisäsi monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuutta maitorasvassa verrattuna rypsiin. *Chlorella vulgaris* sisältääkin *Spirulina* selvästi enemmän monitydyttymättömiä rasvahappoja, mikä voi selittää eroa tutkimusten välillä (Ötles ja Pire, 2001). Erot mikrolevien rasvahappokoostumuksen välillä eivät kuitenkaan kokonaan selitä eroa maitorasvan monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuudessa. Lammisen ym. (2019b) tutkimuksessa mikroleväruokinnat,

jotka sisälsivät *Chlorella vulgaris* –levää tai *Chlorella vulgaris* –levän ja *Nannochloropsis gaditana* -levän seosta, lisäsivät monityydyttymättömien rasvahappojen pitoisuutta maitorasvassa verrattuna Spirulinaan, vaikkei monityydyttymättömien rasvahappojen saannissa ollutkaan eroja.

Yksittäisistä monityydyttymättömistä rasvahapoista Spirulina lisäsi maitorasvan γ -linoleenihappopitoisuutta, mikä oli Spirulinan lipidien suuren γ -linoleenihappopitoisuuden vuoksi odotettavissa. Maitorasvan γ -linoleenihappopitoisuus oli kuitenkin erittäin pieni, minkä vuoksi ihmisravitsemuksen kannalta pitoisuuden lisäys ei ole merkittävä. Vaikka mikrolevät sisältävätkin runsaasti monityydyttymättömiä rasvahappoja, ei maidon tai juuston aistinvaraisessa laadussa ole havaittu merkittäviä muutoksia DHA-rikastettua mikrolevävalmistetta käytettäessä (Bragaglio ym. 2015, Till ym. 2019). Tässä tutkimuksessa maitorasvan monityydyttymättömien rasvahappojen pitoisuus maitorasvassa oli kaikissa ruokinnoissa pienempi kuin Bragaglion ym. (2015) ja Tillin ym. (2019) tutkimuksissa, joten voidaan olettaa, ettei maidon aistinvarainen laatu heikentynyt mikrolevän korvatesa rypsin valkuaista.

Pötsin biohydrogenaatiosta johtuen maitorasvan öljyhappopitoisuudessa ei ollut eroja eri valkuaisruokinnoissa, vaikka öljyhapon saanti oli selvästi runsaampaa rypsirookinnassa verrattuna mikrolevää sisältäviin ruokintoihin. Koska niin steariinihapon kuin öljyhapon saanti vähenivät Spirulinan valkuaisen korvatesa rypsin valkuaista, väheni myös maitorasvan steariinihappopitoisuus. Ylisen (2016) maisterintutkielmassa maitorasvan öljyhappopitoisuus väheni mikrolevien valkuaisen korvatesa rypsin valkuaista, kun taas steariinihappopitoisuudessa ei ollut eroja. Maitorauhasessa $\Delta 9$ -desaturaasientsyymi lisää steariinihappoon, palmitiinihappoon ja vakseenihappoon kaksoissidoksen muodostaen steariinihaposta öljyhappoa, palmitiinihaposta palmitoleiinihappoa ja vakseenihaposta rumeenihappoa (Palmqvist ym. 2005, Shingfield ym. 2010). Maitorasvan steariinihappopitoisuuden väheneminen on sen saannin vähenemisen lisäksi voinut osittain johtua myös siitä, että öljyhapon saanti väheni mikroleväruokinnoissa. Muutokset maitorasvan palmitoleiinihappo- ja rumeenihappopitoisuudessa olivat odotetusti samansuuntaisia kuin muutokset palmitiinihappo- ja vakseenihappopitoisuudessa. Ylisen (2016) tutkimuksessa maitorasvan palmitiinihappopitoisuus lisääntyi mikroleväruokinnoissa, mutta palmitoleiinihappopitoisuudessa ei sen sijaan ollut eroja verrattuna rypsirookintaan. Erot maidon rasvahappokoostumuksessa tutkimusten välillä

ovat voineet johtua eroista rasvahappojen saannissa tai maitorauhasen erilaisesta desaturaasientsyymiaktiivisuudesta. Tässä tutkimuksessa maitorasvan vakseenihappopitoisuus lisääntyi valkuaisruokinnoissa ja väheni Spirulinan korvatessa rypsin valkuaista. Vakseenihappoa syntyy pötsissä etenkin monityydyttymättömien rasvahappojen biohydrogenaation välituotteena sekä jonkin verran öljyhapon biohydrogenaatiossa (Shingfield ym. 2010). Monityydyttymättömien rasvahappojen saannissa ei kuitenkaan ollut eroa eri ruokintojen välillä. Maitorasvan suurempi vakseenihappopitoisuus rypsi-ruokinnoissa verrattuna kontrolliruokintaan ja Spirulinaa sisältäviin ruokintoihin onkin todennäköisesti johtunut öljyhapon runsaasta saannista rypsi-ruokinnassa.

Tässä tutkimuksessa lyhytketjuisten rasvahappojen (C 4-14) pitoisuus maitorasvassa ei eronnut eri ruokinnoissa. Yksittäisistä lyhytketjuisista rasvahapoista voihiapon pitoisuus maitorasvan rasvahapoista lisääntyi lineaarisesti Spirulinan korvatessa rypsin valkuaista. Maitorauhanen syntetisoi voihiappoa joko β -hydroksibutyraatista tai kahdesta asetaattimolekyylistä. Spirulinaa sisältävissä ruokinnoissa veren β -hydroksibutyraattipitoisuus lisääntyi lineaarisesti tilastollisesti suuntaa-antavasti, mikä todennäköisesti lisäsi maitorasvan voihiappopitoisuutta. Maitorauhasen β -hydroksibutyraatin otossa ei kuitenkaan havaittu vastaavaa eroa. Koska maitorauhanen ei pysty syntetisoimaan hiiliketjultaan 18-hiilisiä tai pidempiä rasvahappoja, ovat kaikki maidon vähintään 18-hiiliset rasvahapot peräisin joko ruokinnasta tai rasvakudoksesta (Chilliard ym. 2007). Plasman vapaiden rasvahappojen pitoisuuden lisääntyessä pitkäketjuisten rasvahappojen pitoisuuden maitorasvassa on havaittu lisääntyvän. Vaikka tässä tutkimuksessa valtimoveren NEFA-pitoisuus lisääntyi Spirulinan korvatessa rypsin valkuaista, pitkäketjuisten rasvahappojen pitoisuus maitorasvassa väheni. Syynä tähän lienee pitkäketjuisten rasvahappojen saannin väheneminen leväruokinnoissa.

7.5 Pötsikäyminen, plasman energiametaboliitit ja maitorauhasen ravintoaineiden otto

Tässä tutkimuksessa Spirulina lisäsi isovaleriaanahapon ja isovoihiapon pitoisuutta pötsinesteessä. Pötsissä hajoava valkuainen lisää haaraketjuisten haihtuvien rasvahappojen (iso-VFA) määrää pötsissä (El-Shazly K. 1952, Annison E. F. 1954).

Etenkin haaraketjuiset aminohapot ovat iso-VFA:n lähtöaineita (El-Shazly K. 1952). Tässä tutkimuksessa käytetyn Spirulinan valkuainen sisälsi enemmän haaraketjuisia aminohappoja kuin rypsi. Tutkimuksessa käytetyn Spirulinan aminohappokoostumus on esitetty Lammisen ym. (2017) julkaisussa. Spirulinan pötsihajoavuuden on havaittu *in vitro* –tutkimuksissa olevan suurempi kuin rypsin (Costa ym. 2014).

Kun Spirulina korvasi rypsin valkuaista, valtimoveren plasman NEFA-pitoisuus lisääntyi lineaarisesti. Plasman NEFA-pitoisuuden lisääntyminen näkyi myös maitorauhasen NEFA:n otossa. Mäkisen (2016) maisterintutkielmassa valtimoveren plasman NEFA-pitoisuus ei muuttunut Spirulinan korvatta rypsin tai härkävun valkuaisesta. Lammisen ym. (2017 koe 1) tutkimuksessa Spirulina- ja *Chlorella vulgaris* –mikrolevien seoksen korvatta rypsin valkuaista ei plasman NEFA-pitoisuus muuttunut. Tässä tutkimuksessa plasman NEFA-pitoisuus (0,10 – 0,11 mmol/l) kuitenkin pysyi samassa suuruusluokassa kuin Mäkisen (2016) ja Lammisen ym. (2017 koe 1) tutkimuksissa, joissa plasman NEFA-pitoisuus vaihteli 0,10 – 0,14 mmol/l. Mikäli dieetissä on niukasti energiaa, lehmät mobilisoivat kudosasvojaan energianlähteeksi, mikä näkyy veren NEFA-pitoisuuden lisääntymisenä. Koska lehmät söivät vähemmän väkirehua Spirulinan korvatta rypsin valkuaista, on mahdollista, että plasman NEFA-pitoisuuden lisääntyminen johtui kudosasvojen käytöstä energianlähteenä. Bjerre-Harpøth ym. (2012) havaitsivat, että energiansaannin väheneminen laktaatiokauden keski- ja loppuvaiheissa lisäsi plasman NEFA-pitoisuutta, mutta plasman β -hydroksibutyraattipitoisuudessa ei havaittu muutoksia. Heidän mukaansa tulos kertoi siitä, että NEFA:n muodostus rasvakudoksesta riitti täyttämään energiatarpeen. Drackleyn (1999) mukaan positiivisessa energiataseessa lypsylehmän plasman NEFA-pitoisuus on alle 0,2 mmol/l. Lehmien kuntoluokka ei tässä tutkimuksessa muuttunut jaksojen välillä ja niiden elopaino lisääntyi hieman kokeen aikana, joten ne eivät ole olleet negatiivisessa energiataseessa koejaksojen aikana.

Tässä tutkimuksessa plasman β -hydroksibutyraattipitoisuus lisääntyi lineaarisesti tilastollisesti suuntaa-antavasti Spirulinan korvatta rypsin valkuaista. Plasman β -hydroksibutyraattipitoisuus pysyi kuitenkin alle 1 mmol/l, mitä pidetään subkliinisen ketoosin raja-arvona (Duffield 2000). Osa pötsissä syntyvästä voihaposta muutetaan pötsin epiteelisoluissa β -hydroksivoihapoksi ja pötsiin infusoidun voihaapon on havaittu lisäävän plasman β -hydroksibutyraattipitoisuutta (Leng ja West 1969, Krehbibl ym.

1992). Lampailla tehdyssä tutkimuksessa jopa yli 90% β -hydroksivoihaposta oli peräisin pötsistä imeytyvästä voihaposta (Leng ja West, 1969). Tässä tutkimuksessa pötsinesteen voihappopitoisuus ei muuttunut Spirulinan korvatessa rypsin valkuaista. Annisonin ja Penningtonin tutkimuksessa (1952) pötsinesteen isovoihapon pitoisuuden lisääntyminen ei lisännyt ketoaineiden muodostumista pötsin epiteelissä. Joten pötsinesteen isovoihappopitoisuuden lisääntyminen tässä tutkimuksessa ei liene ollut syynä veren β -hydroksibutyraattipitoisuuden lisääntymiseen. Lengin ja Westin (1969) mukaan pitkittyneessä energiavajeessa on mahdollista, että ketoaineet syntetisoidaan maksassa veren vapaista rasvahapoista, kun taas energian saannin ollessa tasapainossa β -hydroksibutyraatti syntetisoitaisiin pötsin epiteelissä.

Valtimoveren plasman glukoosi- tai etikkahappopitoisuuksissa ei ollut eroa eri ruokinnoissa. Plasman insuliinipitoisuus lisääntyi tilastollisesti suuntaa-antavasti silloin, kun Spirulinan valkuainen korvasi puolet rypsin valkuaisessa. Kun Spirulinan valkuainen korvasi rypsin valkuaisen kokonaan, plasman insuliinipitoisuus sen sijaan väheni. Lammisen ym. (2017 koe 2) julkaisussa on esitetty tämän kokeen tuloksia aminohappojen saannin osalta ja julkaisusta käy ilmi, että Spirulinan korvatessa rypsin valkuaista aminohappojen saanti lisääntyi lineaarisesti. Aminohappojen saannin tiedetään stimuloivan insuliinin eritystä, mikä voi olla syynä plasman insuliinipitoisuuden lisääntymiseen rypsiä ja Spirulinaa sisältävässä ruokinnassa. Koska väkirehun syönnin osuus oli pienin silloin, kun valkuaiestäydennys oli pelkästään Spirulinaa, on mahdollista, että kyseisessä dieetissä lehmien energiansaanti oli vähäisempää kuin muissa dieeteissä. Energian saannin väheneminen saattaakin olla syynä siihen, miksi insuliinia erittyi vähemmän silloin, kun Spirulina oli ainoa valkuaiestäydennysrehu. Koska väkirehuruokinta lisää lypsylehmien plasman glukoosipitoisuutta, on väkirehun syönnin osuuden väheneminen todennäköisesti ollut syy myös maitorauhasen glukoosin oton vähenemiseen leväruokinnoissa. Glukoosin oton väheneminen näkyi myös maidon laktoosipitoisuuden vähenemisenä tilastollisesti suuntaa-antavasti.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Vastoin tutkimuksen ensimmäistä hypoteesia, valkuaiestäydennys ei lisännyt tuotoskauden keskivaiheessa olevien lehmien kuiva-aineen kokonaissyöntiä eikä

maitotuotosta nurmisäilörehuvaltaisessa ruokinnassa. Säilörehun syönti sen sijaan lisääntyi tilastollisesti suuntaa-antavasti. Koska tutkimuksessa käytetyn säilörehun D-arvo oli pieni, mahdollinen energian puute pötsissä on saattanut rajoittaa valkuaisen hyväksikäyttöä, minkä vuoksi maitotuotostavastetta ei saatu. Spirulinan valkuaisen korvauksessa rypsin valkuaisesta väkirehun syönti väheni, mikä todennäköisesti on johtunut mikrolevän heikommasta maistavuudesta verrattuna rypsiin. Lehmät kuitenkin kompensoivat vähentynyttä väkirehun syöntiä lisäämällä säilörehun syöntiä, joten kokonaissyönnissä ei ollut eroja eri valkuaisruokinnassa. Tämän tutkimuksen perusteella valkuais täydennys ei lisää maitotuotosta eikä maidon rasva- ja valkuaispitoisuutta tuotokauden keskivaiheessa olevilla lypsylehmillä nurmisäilörehupohjaisessa ruokinnassa. Tutkimuksen perusteella rypsin valkuaisen voi kuitenkin erillisruokinnassa korvata osittain tai kokonaan Spirulinan valkuaisella ilman, että kokonaissyönti tai maitotuotos vähenee.

Tutkimuksen ensimmäisen hypoteesin mukaisesti maidon rasva- ja valkuaispitoisuus ei vähentynyt Spirulinan valkuaisen korvauksessa rypsin valkuaisesta. Maitorasvan öljyhappokoostumuksessa ei ollut Spirulina-ruokinnassa eroa verrattuna rypsiinruokintaan, vaikka Spirulina sisälsi selvästi rypsiä vähemmän öljyhappoa. Sen sijaan steariinihapon pitoisuus maitorasvassa väheni Spirulinan korvauksessa rypsin valkuaisesta. Steariinihappo on pötsin tyydyttymättömien rasvahappojen biohydrogenaation lopputuote, joten steariinihapon saannin vähenemisen lisäksi öljyhapon saannin väheneminen leväruokinnassa voi selittää maitorasvan steariinihappopitoisuuden vähenemistä mikrolevää sisältävissä ruokinnassa. Rypsin valkuaisen korvaaminen Spirulinan valkuaisella lisäsi odotetusti maitorasvan γ -linoleenihappopitoisuutta. Vaikka maitorasvan rasvahappokoostumuksessa havaittiin tilastollisesti merkitseviä muutoksia, olivat ne määrällisesti niin pieniä, etteivät ne vaikuta maidon ominaisuuksiin elintarvikkeena tai maidon terveellisyyteen ihmisravitsemuksessa.

KIITOKSET

Haluan esittää suurimmat kiitokseni yliopistotutkija Anni Halmemies-Beauchet-Filleaulle ja professori Aila Vanhatalolle neuvoista, kommenteista sekä ennen kaikkea kannustuksesta tutkielmani parissa. Lisäksi haluan kiittää myös yliopistonlehtori Tuomo Kokkosta kärsivällisyydestä ja ohjauksesta tilastollisten analyysien teossa.

Suuret kiitokset myös opiskelutovereilleni, joiden kanssa olen saanut kulkea tämän matkan. Kiitos perheelleni tuesta, kannustuksesta ja ymmärryksestä. Kiitos ystävilleni lähellä ja kaukana – ilman teitä elämäni olisi ilotonta. Erityinen kiitos Vapulle ja Eetulle loputtomasta tuesta ja kannustuksesta sekä kaikista naurunremakoista, joilla olette päiviäni piristäneet. Kiitos Nikolle valmiudesta hoitaa koiria aina, kun tarvitsin. Kiitos Tintille vertaistuesta niin graduahdistuksen kuin kaiken muunkin maailmantuskan parissa. Viimeiseksi suunnaton kiitos Karrille aivan kaikesta.

LÄHTEET

- Alexander, D.D., Bylsma, L.C., Vargas, A.J., Cohen, S.S., Doucette, A., Mohamed, M., Irvin, S.R., Miller, P.E., Watson, H. & Fryzek, J.P. 2016. Dairy consumption and CVD: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition* 115: 737–750.
- Angulo, J., Mahecha, L., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Dannenberger, D., Olivera, M., Boutinaud, M., Leroux, C., Albrecht, E. & Bernard, L. 2012. Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. *Animal* 6: 1961–1972.
- Annison, E. F. & Pennington, R. J. 1954. The metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. 3. Formic, n-valeric and some branched-chain acids. *The Biochemical journal* 57: 685–692.
- Barker, S.B. & Summerson, W.H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological materials. *The Journal of Biological Chemistry* 138: 537–554.
- Becker, E.W. 2013, *Microalgae for Human and Animal Nutrition*, teoksessa *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, s. 461–503.
- Belyea RL & Adams, M.W 1990. Energy and Nitrogen Utilization of High Versus Low Producing Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 73: 1023–1030.
- Bjerre-Harpøth, V., Friggens, N.C., Thorup, V.M., Larsen, T., Damgaard, B.M., Ingvarsten, K.L. & Moyes, K.M. 2012, Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *Journal of Dairy Science* 95: 2362–2380.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A. & Fievez. 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.
- Bojanowska, M. 2017. Changes in chemical composition of rapeseed meal during storage, influencing nutritional value of its protein and lipid fractions. *Journal of Animal and Feed Sciences* 26:157–164.

- Bragaglio, A., Braghieri, A., Napolitano, F., De Rosa, G., Riviezzi, A.M., Surianello, F. & Pacelli, C. 2015. Omega-3 supplementation, milk quality and cow immune-competence. *Italian Journal of Agronomy* 10: 9.
- Bulut, S., Kanber, G., Tirindaz, Ç, Kara, H.H., Mert, R. & Konuk, M. 2015. Investigation of fatty acids of milk from different cow breeds. *Journal of Food Safety and Food Quality* 66: 168–171.
- Calabrese, I. & Riccardi, G. 2019, Effectiveness of Changes in Diet Composition on Reducing the Incidence of Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reports* 21: 88.
- Cant, J. P., E. J. DePeters, and R. L. Baldwin. 1993. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *Journal of Dairy Science* 76: 762–774.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J. & Doreau, M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat, *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109: 828–855.
- Christaki E, Karatzia, M., Bonos, E., Paneri, P.F. & Karatzias, C. 2011. Dietary spirulina in dairy cows. *Current Opinion in Biotechnology* 22 (supp. 1) 40.
- Christensen, R.A., Lynch, G.L., Clark, J.H. & Yu, Y. 1993. Influence of Amount and Degradability of Protein on Production of Milk and Milk Components by Lactating Holstein Cows 1. *Journal of Dairy Science* 76: 3490–3496.
- Costa, D.F., 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.
- Cyriac, J., Rius, A.G., McGilliard, M.L., Pearson, R.E., Bequette, B.J. & Hanigan, M.D. 2008. Lactation Performance of Mid-Lactation Dairy Cows Fed Ruminally Degradable Protein at Concentrations Lower Than National Research Council Recommendations. *Journal of Dairy Science* 91: 4704–4713.
- Doreau M, Ferlay A. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 1994 45: 379–96.

- Drackley, J. K. 1999. Biology of dairy cows during the *transition* period: the final frontier? *Journal of Dairy Science* 82: 2259–2273.
- Drouin–Chartier, J., Brassard, D., Tessier–Grenier, M., Côté, J.A., Labonté, M., Desroches, S., Couture, P. & Lamarche, B. 2016. Systematic Review of the Association between Dairy Product Consumption and Risk of Cardiovascular–Related Clinical Outcomes. *Advances in Nutrition* 7: 1026–1040.
- Duffield, T. 2000, Subclinical Ketosis in Lactating Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 16: 231–253.
- El–Shazly, K. 1952. Degradation of protein in the rumen of the sheep 2: The action of rumen micro–organisms on amino–acids. *Biochemical Journal* 51: 647.
- Emanuelson M, Ahlin, K.–. & Wiktorsson, H. 1993. Long–term feeding of rapeseed meal and full–fat rapeseed of double low cultivars to dairy cows. *Livestock Production Science* 33: 199–214.
- Enjalbert F, Nicot M, Bayourthe C, Moncoulon R. 1998. Duodenal Infusions of Palmitic, Stearic or Oleic Acids Differently Affect Mammary Gland Metabolism of Fatty Acids in Lactating Dairy Cows. *Journal of Nutrition* 128: 1525–1532.
- 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.
- 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.
- Garnsworthy, P.C., Masson, L.L., Lock, A.L. & Mottram, T.T. 2006. Variation of Milk Citrate with Stage of Lactation and De Novo Fatty Acid Synthesis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 89: 1604–1612.
- Glasser, F., Ferlay, A. & Chilliard, Y. 2008. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A meta–analysis. *Journal of Dairy Science* 91: 4687–4703.

- Glover KE, Budge, S., Rose, M., Rupasinghe, H.P.V., MacLaren, L., Green-Johnson, J. & Fredeen, A.H. 2012. Effect of feeding fresh forage and marine algae on the fatty acid composition and oxidation of milk and butter. *Journal of Dairy Science* 2797–2809.
- Grummer, R.R. 1991, Effect of Feed on the Composition of Milk Fat. *Journal of Dairy Science* 74: 3244–3257.
- Halmemies-Beauchet-Filleau A. 2013. Role of forage species and conservation method in ruminal lipid metabolism, mammary lipogenesis and milk fatty acid composition in lactating cows. *Helsingin yliopisto, väitöskirja*.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kairenius, P., Ahvenjärvi S., Toivonen, V., Huhtanen, P., Vanhatalo, A., Givens, D. I. & Shingfield K. J. 2013. Effect of forage conservation method on plasma lipids, mammary lipogenesis, and milk fatty acid composition in lactating cows fed diets containing a 60:40 forage-to-concentrate ratio. *Journal of Dairy Science* . 96:5267–5289.
- Halmemies-Beauchet-Filleau A, Kokkonen, T., Lampi, A.–., Toivonen, V., Shingfield, K.J. & Vanhatalo, A. 2011. Effect of plant oils and camelina expeller on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on red clover silage. *Journal of Dairy Science* 94: 4413–4430.
- Heikkilä, T., Toivonen, V. & Huhtanen, P. 1998. Effects of and interactions between the extent of silage fermentation and protein supplementation in lactating dairy cows. *Agricultural and Food Science* 7: 329–343.
- Heuzé V., Tran G., Lebas F., 2017. Microalgae. *Feedipedia*, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/67>. Julkaistu: 2017, viitattu: 10.1.2020.
- Heuzé V., Tran G., Sauvant D., Lessire M., Lebas F., 2019. Rapeseed meal. *Feedipedia*, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/52>. Julkaistu: 2019, viitattu: 20.12.2019.
- Hristov, A.N., Domitrovich, C., Wachter, A., Cassidy, T., Lee, C., Shingfield, K.J., Kairenius, P., Davis, J. & Brown, J. 2011. Effect of replacing solvent-extracted

canola meal with high-oil traditional canola, high-oleic acid canola, or high-erucic acid rapeseed meals on rumen fermentation, digestibility, milk production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94: 4057–4074.

Hristov, A.N., Price, W.J. & Shafii, B. 2004, A Meta-Analysis Examining the Relationship Among Dietary Factors, Dry Matter Intake, and Milk and Milk Protein Yield in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 87: 2184–2196.

Huhtanen, P. 1998, Supply of nutrients and productive responses in dairy cows given diets based on restrictively fermented silage. *Agricultural and Food Science in Finland* 7: 219–250.

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, Khalili, H., Nousiainen, J.I., Rinne, M., Jaakkola, S., Heikkilä, T. & Nousiainen, J. 2002. Prediction of the relative intake potential of grass silage by dairy cows. *Livestock Production Science* 73: 111–130.

Huida, L., Väättäinen, 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.

Jaakkola S., Sairanen, A., Rinne, M. & Nousiainen J. 2010. Säilöntä ja rehujen laatu. Teoksessa: Peltonen, S., Puurunen, T. & Harmoinen T. (toim.). *Nurmirehujen tuotanto ja käyttö*. Hämeenlinna: ProAgria Keskusten Liitto. s. 87 – 95.

Jensen, R.G. 2002. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science* 85: 295–350.

Kairenius, P., Ärölä, A., Leskinen, H., Toivonen, V., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Hurme, T., Griinari, J.M. & Shingfield, K.J. 2015. Dietary fish oil supplements depress milk fat yield and alter milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 98: 5653–5671.

- Kalscheur, K.F., Vandersall, J.H., Erdman, R.A., Kohn, R.A. & Russek-Cohen, E. 1999. Effects of Dietary Crude Protein Concentration and Degradability on Milk Production Responses of Early, Mid, and Late Lactation Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 82: 545–554.
- Karmitsa E. 2018. Algonomi tuottaa arvokkaita mikroleviä teollisuuden poistovesistä. <https://www.helsinki.fi/fi/uutiset/elamantieteet/algonomi-tuottaa-arvokkaita-mikrolevia-teollisuuden-poistovesista>. Julkaistu 26.11.2018, viitattu 12.1.2020.
- Kaukovirta-Norja, A., Leinonen, A., Mokka, M., Wessberg, N. & Niemi, J. 2015. Tiekartta Suomen proteiiniomavaraisuuden parantamiseksi. <http://jukuri.luke.fi/handle/10024/531664> Helsinki, Suomi. Teknologian tutkimuskeskus VTT. Julkaistu 2015, viitattu 15.1.2020.
- Kay, J.K., Weber, W.J., Moore, C.E., Bauman, D.E., Hansen, L.B., Chester-Jones, H., Crooker, B.A. & Baumgard, L.H. 2005. Effects of Week of Lactation and Genetic Selection for Milk Yield on Milk Fatty Acid Composition in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* 88: 3886–3893.
- Kidane, A., Øverland, M., Mydland, L.T. & Prestløy, E. 2018. Milk production of Norwegian Red dairy cows on silages presumed either low or optimal in dietary crude protein content. *Livestock Science* 214: 42–50.
- Kliem KE, Shingfield, K.J., Humphries, D.J. & Givens, D.I. 2011. Effect of replacing calcium salts of palm oil distillate with incremental amounts of conventional or high oleic acid milled rapeseed on milk fatty acid composition in cows fed maize silage-based diets. *Animal* 5: 1311–1321.
- Kokkonen, T., Tuori, M., Leivonen, V. & Syrjälä-Qvist, L. 2000. Effect of silage dry matter content and rapeseed meal supplementation on dairy cows. 1. Milk production and feed utilization. *Animal Feed Science and Technology* 84: 213–228.
- Krehbiel, C.R., Harmon, D.L. & Schneider, J.E. 1992. Effect of increasing ruminal butyrate on portal and hepatic nutrient flux in steers. *Journal of Animal Science* 70: 904–914.
- Lamminen M. 2019. Potential of Microalgae to Replace Conventional Protein Feeds for Sustainable Dairy Cow Nutrition. Helsingin yliopisto, väitöskirja.

- Lamminen, M., Halmemies–Beauchet–Filleau, A., Kokkonen, T., Simpura, I., Jaakkola, S. & Vanhatalo, A. 2017. Comparison of microalgae and rapeseed meal as supplementary protein in the grass silage based nutrition of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 234: 295–311.
- Lamminen M, Halmemies–Beauchet–Filleau, A., Kokkonen, T., Vanhatalo, A. & Jaakkola, S. 2019a. The effect of partial substitution of rapeseed meal and faba beans by *Spirulina platensis* microalgae on milk production, nitrogen utilization, and amino acid metabolism of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102: 7102–7117.
- Lamminen M, Halmemies–Beauchet–Filleau A, Kokkonen T, Jaakkola S, Vanhatalo A. 2019b. Different microalgae species as a substitutive protein feed for soya bean meal in grass silage based dairy cow diets. *Animal Feed Science and Technology* 247: 112-126
- Larsen MK, Hymøller, L., Brask–Pedersen, D.B. & Weisbjerg, M.R. 2012. Milk fatty acid composition and production performance of Danish Holstein and Danish Jersey cows fed different amounts of linseed and rapeseed. *Journal of Dairy Science* 95: 3569–3578.
- Lawson, L.D. & Hughes, B.G. 1988. Triacylglycerol structure of plant and fungal oils containing γ -linolenic acid. *Lipids* 23: 313–317.
- Leng, R.A. & West, C.E. 1969. Contribution of Acetate, Butyrate, Palmitate, Stearate and Oleate to Ketone Body Synthesis in Sheep. *Research in Veterinary Science* 10: 57–63.
- Lerch, S., Ferlay, A., Shingfield, K.J., Martin, B., Pomiès, D. & Chilliard, Y. 2012. Rapeseed or linseed supplements in grass–based diets: Effects on milk fatty acid composition of Holstein cows over two consecutive lactations. *Journal of Dairy Science* 95: 5221–5241.
- Lock, A.L. & Bauman, D.E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39: 1197–1206.

- Lu, H. & Daugherty, A. 2015. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. *Atherosclerosis* 35: 485–491.
- Luonnonvarakeskus 2019a. Tilastotietokanta. Elintarvikkeiden kulutus henkeä kohti. https://statdb.luke.fi/PXWeb/pxweb/fi/LUKE/LUKE_02%20Maatalous_08%20Muut_02%20Ravintotase/01_Elintarvikkeiden_kulutus.px/table/tableViewLayout1/?rxid=e74cef6b-1011-4f02-ae4-5757913ea3a6. Viitattu: 19.12.2019
- Mäkinen H., 2016. Rypsi, härkäpapu ja mikrolevä (*Spirulina platensis*) lypsylehmien valkuaistäydennyksenä: vaikutus pötsikäymiseen, plasman energiametaboliitteihin ja maidontuotantoon. Helsingin yliopisto, maisterintutkielma. 55 s.
- Månsson, H.L. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research* 52:
- Mäntysaari P, Huhtanen, P., Nousiainen, J. & Virkki, M. 2004. The effect of concentrate crude protein content and feeding strategy of total mixed ration on performance of primiparous dairy cows. *Livestock Production Science* 85: 223–233.
- Markou G & Georgakakis, D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue–green algae) in agro–industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88: 3389–3401.
- Mata TM, Martins, A.A. & Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217–232.
- Mele M, Macciotta, N.P.P., Cecchinato, A., Conte, G., Schiavon, S. & Bittante, G. 2016. Multivariate factor analysis of detailed milk fatty acid profile: Effects of dairy system, feeding, herd, parity, and stage of lactation. *Journal of Dairy Science* 99: 9820–9833.
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D. & Katan, M.B. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta–analysis of 60 controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77: 1146–1155.
- 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.
- Mustonen M. ja Vuorre M. 2019. Mikrolevä puhdistaa jätevesiä ja tuottaa energiaa. <https://www.uef.fi/~mikroleva-puhdistaa-jatevesia-ja-tuottaa-bioenergiaa>. Julkaistu 30.1.2019, viitattu: 12.1.2020.
- 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.
- Okrouhlá, M., Stupka, R., Čítek, J., Lebedová, N. & Zadinová, K. 2018. Effect of Duration of Dietary Rapeseed and Soybean Oil Feeding on Physical Characteristics, Fatty Acid Profile, and Oxidative Stability of Pig Backfat. *Animals (Basel)* 8: 193.
- Oldham, J.D. 1984. Protein–energy interrelationships in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 67: 1090–1114.
- Otles, S. & Pire, R. 2001. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *Journal of AOAC International* 84: 1708–14.
- Palladino, R.A., Buckley, F., Prendiville, R., Murphy, J.J., Callan, J. & Kenny, D.A. 2010. A comparison between Holstein–Friesian and Jersey dairy cows and their F1 hybrid on milk fatty acid composition under grazing conditions. *Journal of Dairy science* 93: 2176–2184.
- Palmquist, D.L., Denise Beaulieu, A. & Barbano, D.M. 1993. Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. *Journal of Dairy Science* 76: 1753–1771.
- Palmquist DL, Lock, A.L., Shingfield, K.J. & Bauman, D.E. 2005. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. *Advances in Food and Nutrition Research* 50: 179–217.
- Panjaitan, T., Quigley, S.P., McLennan, S.R., Swain, A.J. & Poppi, D.P. 2015. *Spirulina* (*Spirulina platensis*) algae supplementation increases microbial protein production and feed intake and decreases retention time of digesta in the rumen of cattle. *Animal Production Science* 55: 535–543.

- Patton, S. & Jensen, R.G. 1975. Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* 14: 163–277
- Póti, P., Pajor, F., Bodnár, Á, Penksza, K. & Köles, P. 2015. Effect of micro–alga supplementation on goat and cow milk fatty acid composition. *Chilean journal of agricultural research* 75: 259–263.
- 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.
- Roffler, R.E. & Thacker, D.L. 1983. Early Lactational Response to Supplemental Protein by Dairy Cows Fed Grass–Legume Forage. *Journal of Dairy Science* 66: 2100–2108.
- Sakhno, L.O. 2010. Variability in the fatty acid composition of rapeseed oil: Classical breeding and biotechnology. *Cytology and Genetics* 44: 389–397.
- Shingfield, K.J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Vanhatalo, A., Huhtanen, P. & Griinari, J.M. 2008. Effect of incremental levels of sunflower–seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *British Journal of Nutrition* 99: 971–983.
- Shingfield, K.J., Bernard, L., Leroux, C. & Chilliard, Y. 2010. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4: 1140–1166.
- Sjaunja, L.O., Baevre, L., Junkarinen, L., Pedersen, J. & Setälä, J. 1990. A Nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. Teoksessa P. Gaillon & Y. Chabert (toim). *Performance Recording of Animals: State of the Art–1990*. PUDOC, Wageningen, Alankomaat: EAAP Publication no. 50: 156–157.
- Stoop, W.M., Bovenhuis, H., Heck, J.M.L. & van Arendonk, J.A.M. 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein–Friesian cows. *Journal of Dairy Science* 92: 1469–1478.
- Ravishankar, G. A., Sarada, R., Vidyashankar, S., Venu Gopal, K.S., Kumudha, A. 2012. Cultivation of micro–algae for lipids and hydrocarbons, and utilization of spent biomass for livestock feed and for bio–active constituents. Teoksessa:

- Makkar, H.P.S (toim.) Biofuel co-products as livestock feed – opportunities and challenges. FAO: 423–446.
- Tanticharoen, M., Reungjitchachawali, M., Boonag, B., Vonktaveesuk, P., Vonshak, A. & Cohen, Z. 1994. Optimization of γ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology* 6: 295–300.
- Till, B.E., Huntington, J.A., Posri, W., Early, R., Taylor–Pickard, J. & Sinclair, L.A. 2019. Influence of rate of inclusion of microalgae on the sensory characteristics and fatty acid composition of cheese and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102: 10934–10946.
- Tuori, M. 1992. Rapeseed meal as a supplementary protein for dairy cows on grass silage-based diet, with the emphasis on the Nordic AAT–PBV feed protein evaluation system. *Agricultural Science in Finland* 1: 367–439.
- 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.
- Wu, Z. & Satter, L.D. 2000. Milk Production During the Complete Lactation of Dairy Cows Fed Diets Containing Different Amounts of Protein. *Journal of Dairy Science* 83: 1042–1051.
- Ylinen, V. 2015. Mikrolevä lypsylehmien valkuaisrehuna: vaikutus syöntiin, aineenvaihduntaan ja maidontuotantoon. Helsingin yliopisto, maisterintutkielma. 63 s.

